

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Barbora Otáhalová**

**Inhibiční vliv estrogenních endokrinních disruptorů na aktivitu  
cytochromů P450**

*The inhibitory effect of estrogenic endocrine disruptors on cytochrome P450 activity*

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: **RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.**

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis:

### **Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za trpělivost, ochotu, čas a laskavé jednání, které mi věnovala po celou dobu naší spolupráce a za cenné rady a připomínky, které mi poskytla během sepisování této práce.

Dále bych poděkovala Sandře Jelínkové za pomoc a užitečné připomínky při měření na HPLC.

Na závěr také děkuji za trpělivost a podporu rodiny při tvorbě této práce a během celého studia.

## Abstrakt

Endokrinní disruptory jsou sloučeniny exogenního i endogenního původu, které interferují s přirozenou tvorbou, signalizací nebo metabolismem hormonů v organismu a tím narušují rovnováhu endokrinního systému. Mezi exogenní endokrinní disruptory patří  $17\alpha$ -ethinylestradiol a mezi endogenní endokrinní disruptory  $17\beta$ -estradiol.

V bakalářské práci byl studován vliv těchto endokrinních disruptorů na specifické aktivity potkaních cytochromů P450 1A1 a 3A1. Specifická aktivita CYP1A1 byla stanovena markerovou reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu a specifická aktivita CYP3A1 byla stanovena markerovou reakcí  $6\beta$ -hydroxylace testosteronu.

Bylo potvrzeno, že oba estrogeny  $17\beta$ -estradiol a  $17\alpha$ -ethinylestradiol inhibují aktivitu CYP1A1 i CYP3A1. Silnějším inhibitorem CYP1A1 byl  $17\beta$ -estradiol a silnějším inhibitorem CYP3A1 byl  $17\alpha$ -ethinylestradiol.

Byla stanovena koncentrace estrogenů způsobující 50% inhibici enzymů ( $IC_{50}$ ), pro  $17\beta$ -estradiol byla  $4,6\ \mu\text{M}$  a pro  $17\alpha$ -ethinylestradiol  $7,9\ \mu\text{M}$ . CYP1A1 je významným enzymem biotransformace léčiv a karcinogenů, lze tedy říci, že estrogeny mohou modulovat genotoxicitu karcinogenů aktivovaných CYP1A1.

Výsledky ukazují, že inhibice CYP1A1 se po preinkubaci estrogenů s NADPH (kofaktor cytochromů P450) zvýšila, což naznačuje, že by za inhibici mohly být zodpovědné metabolity  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu vzniklé při jejich preinkubaci s NADPH. Metabolity  $17\beta$ -estradiolu vzniklé při preinkubaci s NADPH zvýšily inhibici dvakrát oproti  $17\beta$ -estradiolu a metabolity  $17\alpha$ -ethinylestradiolu vzniklé při preinkubaci s NADPH zvýšily inhibici čtyřikrát oproti  $17\alpha$ -ethinylestradiolu.

Pro cytochrom P450 3A1 byla koncentrace  $17\beta$ -estradiolu způsobující 50% inhibici  $27,6\ \mu\text{M}$  a koncentrace  $17\alpha$ -ethinylestradiolu způsobující 50% inhibici byla  $8,3\ \mu\text{M}$ . Oba jsou tedy účinnými inhibitory CYP3A1.

**Klíčová slova:** endokrinní disruptory,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -ethinylestradiol, cytochrom P450, inhibice,  $IC_{50}$

## Abstract

Endocrine disruptors are exogenous and endogenous compounds that interfere with the production, signaling and metabolism of natural hormones, thereby disturbing the balance of the endocrine system. Exogenous endocrine disruptors include 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endogenous endocrine disruptors include 17 $\beta$ -estradiol.

This thesis examines effects of these endocrine disruptors on the specific activities of rat cytochromes P450 1A1 and 3A1. The enzyme specific activity of CYP1A1 is determined by the marker reaction *O*-deethylation 7-ethoxyresorufin and the activity of CYP3A1 is determined by the marker reaction 6 $\beta$ -hydroxylation of testosterone.

It has been confirmed that both estrogens 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol inhibit activity of CYP1A1 and CYP3A1. The stronger inhibitor of CYP1A1 was 17 $\beta$ -estradiol and of CYP3A1 was 17 $\alpha$ -ethinylestradiol.

The concentration of estrogens causing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of enzymes has been determined, for 17 $\beta$ -estradiol it was 4,6  $\mu$ M and for 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 7,9  $\mu$ M. CYP1A1 is a important enzyme for the biotransformation of carcinogens, it can be said that estrogens can modulate the genotoxicity of CYP1A1 activated carcinogens.

The results show that CYP1A1 inhibition increased after pre-incubation of estrogens with NADPH (cofactor of cytochromes P450), that suggest inhibition can be caused by metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol produced by their pre-incubation with NADPH. E2 metabolites produced by pre-incubation with NADPH increased inhibition twice compared to E2. EE2 metabolites produced by preincubation with NADPH increased inhibition four times compared to EE2.

In the case of CYP3A1 IC<sub>50</sub> of 17 $\beta$ -estradiol was 27,6  $\mu$ M and IC<sub>50</sub> of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol was 8,3  $\mu$ M. Both are effective inhibitors of CYP3A1.

(In Czech)

**Key words:** endocrine disruptors, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, cytochrome P450, inhibition, IC<sub>50</sub>

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY.....	10
1.1 Endokrinní disruptory.....	10
1.1.1 Estrogenní sloučeniny.....	11
1.1.2 17 $\beta$ -estradiol.....	13
1.1.2.1 Metabolismus 17 $\beta$ -estradiolu.....	14
1.1.3 17 $\alpha$ -ethinylestradiol.....	15
1.1.3.1 Metabolismus 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu.....	15
1.2 Biotransformační enzymy.....	16
1.2.1 Cytochromy P450.....	16
1.2.2 Inhibitory CYP.....	18
1.2.2.1 Reversibilní inhibitory.....	18
1.2.2.2 Inhibice závislá na katalýze.....	18
1.2.3 Cytochrom P450 1A1.....	19
1.2.4 Cytochromy P450 3A1/2.....	21
1.2.5 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na isoformy cytochromů P450.....	23
1.2.5.1 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na CYP1A1.....	23
1.2.5.2 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na CYP3A1/2.....	25
1.2.5.3 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na další isoformy cytochromu P450.....	25
1.2.6 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na isoformy CYP.....	26
1.2.6.1 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na CYP1A1.....	27
1.2.6.2 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na CYP3A1/2.....	28
1.2.6.3 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na další isoformy cytochromu P450.....	28
2 CÍL PRÁCE.....	29
3 MATERIÁL A METODY.....	30
3.1 Použité chemikálie a rozpouštědla.....	30
3.2 Použité přístroje.....	31
3.3 Použité metody.....	33
3.3.1 Stanovení aktivity CYP1A1 – O-deethylace 7-ethoxyesorufinu.....	33

3.3.2 Stanovení aktivity CYP3A1/2 – 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu.....	35
3.3.2.1 Příprava inkubační směsi.....	35
3.3.2.2 Separace 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....	36
4 VÝSLEDKY.....	37
4.1 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1.....	37
4.2 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A1.....	41
5 DISKUZE.....	45
6 ZÁVĚR.....	48
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	aryluhlovodíkový receptor
Arnt	AhR jaderný translokátor
BaP	benzo[a]pyren
CYP	cytochrom P450
DBD	DNA vázající doména
DEX	dexamethason
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
E1	estron
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	estriol
EDC	endokrinní disruptory
EE2	1 $\alpha$ -ethinylestradiol
ERE	estrogen rozpoznávající úseky DNA
EROD	O-deethylace 7-ethoxyresorufinu
ER $\alpha$	estrogenní receptor $\alpha$
ER $\beta$	estrogenní receptor $\beta$
HAA	heterocyklické aromatické aminy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HsP	proteiny tepelného šoku
IC <sub>50</sub>	koncentrace sloučeniny, díky které je dosaženo 50% maxima inhibičního efektu
LBD	ligand vázající doména
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NIF	nifedepin
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCN	pregnenolon-16 $\alpha$ -karbonitril



PXR	pregnanový X receptor
RPM	počet otáček za minutu
RXR	retinoidní X receptor
SXR	steroidní X receptor
TAD	N-terminální transaktivační doména
TCDD	dioxin
TST	testosteron
v/v	objem/objem
XRE	xenobiotikum rozpoznávající úseky DNA

# 1 ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Za posledních 70 let se objevují informace o tom, že existují některé přírodní a syntetické látky, které mohou napodobovat hormony v endokrinním systému zvířat. Tyto sloučeniny jsou spojovány s mnoha nepříznivými efekty ovlivňujícími lidi i volnou přírodu.<sup>1</sup> Moduluji endokrinní a imunitní systém, což vede k ovlivnění homeostázy, reprodukce, vývoje a chování některých organismů. Mezi nejvýznamnější patologické efekty se řadí vliv na mužský i ženský reprodukční systém, lidskou plodnost, funkci štítné žlázy a centrální nervový systém.<sup>2</sup> Tyto látky se využívají v průmyslu i zemědělství. Aktivní substance byly nalezeny ve všech složkách prostředí v různém koncentračním rozmezí po celé planetě. Tyto sloučeniny se nazývají endokrinní disruptory.<sup>1,3</sup>

## 1.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDC, z angl. „endocrine disrupting compounds“) jsou definovány jako látky nebo směsi, které mění funkce endokrinního systému a následně způsobují nepříznivé zdravotní účinky v intaktním organismu, jeho potomstvu nebo v (sub)populaci.<sup>4</sup> Jsou to látky, které interferují s syntézou, transportem, sekrecí, vazbou, metabolismem, nebo eliminací tělu vlastních hormonů, které zodpovídají za reprodukci, homeostázu, vývojové procesy a chování.<sup>2</sup> Endokrinní disruptory se rozdělují na přírodní sloučeniny (fytoestrogeny, hormony) a sloučeniny syntetické (farmaka, pesticidy, průmyslové chemikálie).<sup>5</sup>

Výzkum v posledních dvaceti letech ukázal, že EDC mohou působit na mnoha místech prostřednictvím různých mechanismů účinku. Můžeme je shrnout do 6 mechanismů působení.<sup>6</sup>

1. Vazba na estrogenový receptor a jeho aktivace.
2. Vazba na estrogenový receptor, ale receptor není aktivován.
3. Vazba na další receptory.
4. Modifikace metabolismu přirozených hormonů.
5. Modifikace řady hormonálních receptorů v buňce.

## 6. Modifikace produktů přirozených hormonů.

Endokrinní disruptory mají velký vliv na lidské zdraví, působí na mužský reprodukční systém (snížení kvality spermií, kryptorchismus, hypospadie), ženský reprodukční systém (endometriosy, neplodnost), zvyšují riziko výskytu rakoviny varlat, prostaty a prsu, narušují vývoj nervového systému a u zvířat způsobují například feminizaci samců u ryb.<sup>1,6</sup>

### 1.1.1 Estrogenní sloučeniny

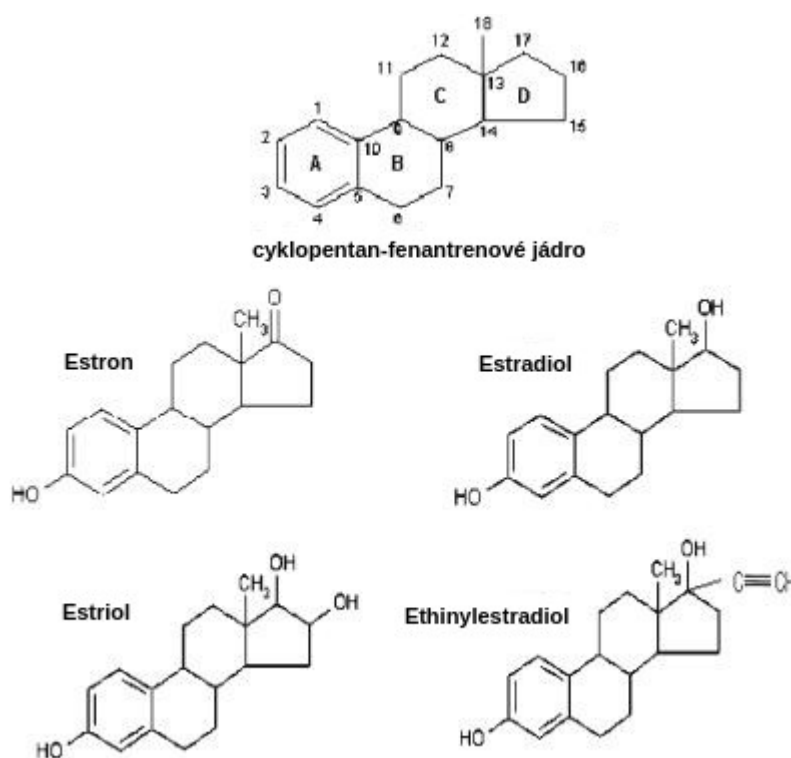
Estrogenní sloučeniny patří mezi steroidní hormony, které ovlivňují růst, diferenciaci a funkci mnoha cílových tkání, především ženského a mužského reprodukčního systému (mléčná žláza, děloha, vagina, vaječníky, varlata, nadvarlata a prostata). Hrají důležitou roli v udržení kvality kostí, v centrální nervovém systému a kardiovaskulárním systému, kde mají jistý kardioprotektivní efekt.<sup>7</sup> Mezi přírodní estrogény savců patří estron (E1), 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\beta$ -estradiol (E2) a estriol (E3). Estrogény vyskytující se u rostlin nazýváme fytoestrogény (isoflavony, kumestany a lignany) a u plísní mykoestrogény.<sup>8,9</sup>

U lidí a jiných živočichů jsou estrogény syntetizovány převážně ve vaječnících, ale také v jiných orgánech jako jsou varlata, mozek, hypothalamus, tuková tkáň a placenta. Estrogenní hormony jsou odvozeny od cholesterolu a pregnenolonu, které jsou transformovány na androstendion a testosteron. Tyto látky jsou přímými prekurzory estrogenů E1, E2 a E3.

Hlavním endogenním steroidním estrogenem, pokud jde o vazbu na lidský estrogenní receptor, je 17 $\beta$ -estradiol. Estradiol je v procesu metabolismu oxidován na estron a dále transformován na estriol. Přírodní estrogény mají stejný tetracyklický vzorec, zahrnující 4 kruhy, jednu fenolickou skupinu, dva cyklohexanové a jeden cyklopentanový kruh. Estradiol je stavební kostrou syntetického estrogenu ethinylestradiolu (EE2), který je součástí hormonální antikoncepce.<sup>10,11</sup>

Struktury přírodních a syntetických estrogenů jsou zobrazeny na Obr. 1, str. 12. Estrogenní účinek mají také mnohé syntetické chemikálie, xenoestrogény, které napodobují aktivitu endogenních hormonů.

V organismu probíhá katabolismus estrogenů v játrech, kde jsou konjugovány na sulfáty, glukuronidy nebo sulfoglukuronidy substitucí na hydroxylových skupinách v pozicích 3 a/nebo 17. Tyto substituce zvyšují rozpustnost estrogenů a usnadňují jejich vylučování výkaly a močí. Ačkoliv mají konjugované estrogены velmi nízkou estrogení aktivitu, ve střevě se díky fekální flóře rozpadají a jsou produkovány estrogeně aktivní volné formy. Aktivní formy jsou čističkami odpadních vod nedostatečně zachycovány a přecházejí tak dále do ekosystému. Následně kontaminují podzemní vody a zdroje pitné vody, čímž se mohou zapojit do potravních řetězců a neblaze působit na zdraví organismů.<sup>3,8</sup>



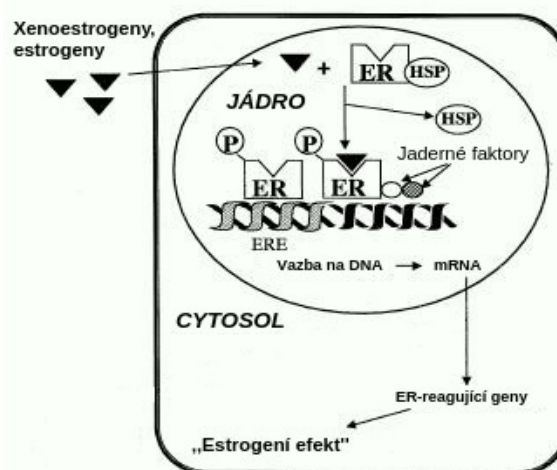
**Obr. 1:** Struktura přírodních a syntetických estrogenů.

(převzato a upraveno z <sup>8</sup>)

### 1.1.2 17 $\beta$ -estradiol

Hlavní estrogení hormon 17 $\beta$ -estradiol (E2), syntetizovaný ve vaječnících a jiných tkáních, hraje ústřední roli v kontrole sexuálního chování a reprodukčních funkcích.<sup>12</sup> Estradiol je často předepisován v rámci postmenopauzální substituční léčby estrogenem a v rámci léčby Alzheimerovy choroby. Bohužel se však stal také jedním z nejrozšířenějších endokrinních disruptorů v životním prostředí. Aktivní substance z léčiv se po požití léku vylučují z těla prostřednictvím výkalů a moči. Díky splaškům odcházejí do čistíren odpadních vod, kde jsou však nedostatečně zachycovány a přecházejí tak dále do povrchových vod.<sup>3,13</sup>

E2 reguluje lidskou fyziologii pomocí difúze skrz plasmatickou membránu cílových buněk a díky speciálním estrogenovým receptorům.<sup>14,15</sup> (Obr. 2) Za přítomnosti normální hladiny E2 se E2 naváže na estrogenový receptor (ER), poté tento E2-ER komplex dimerizuje, vstupuje do jádra, váže se na úsek řetězce DNA (ERE, angl. Estrogen response elements) a dochází k iniciaci transkripce.<sup>13,16</sup> Tímto mechanismem působí i jiné steroidní hormony. E2 však může také modulovat genovou expresi druhým nepřímým mechanismem, který zahrnuje interakci ER s dalšími transkripčními faktory, které spojují podobné úseky DNA.<sup>12</sup>



**Obr. 2:** Buněčná odpověď zprostředkovaná estrogením receptorem (ER).

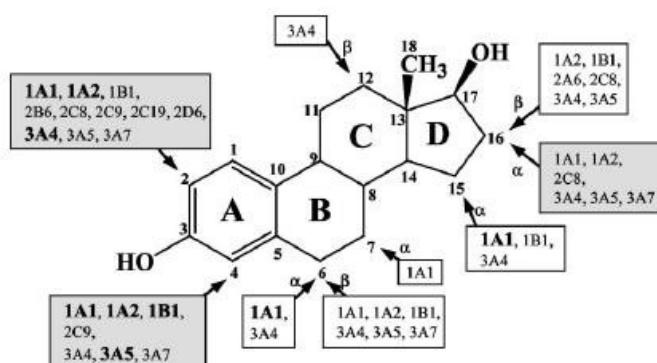
HSP = proteiny tepelného šoku (z angl. Heatshock protein), P = fosfát.

(převzato a upraveno z <sup>15</sup>)

E2 se váže na dva typy intracelulárních receptorů ER $\alpha$  a ER $\beta$ , každý z nich je kódován jedinečným genem. Funkční domény DNA- a ligand vázající doména ER $\alpha$  a ER $\beta$  vykazují vysoký stupeň homologie. Zatímco ER $\alpha$  je převažujícím podtypem exprimovaným v prsech, děloze a dalších cílových tkáních, ER $\beta$  je exprimován ve vaječnících, prostatě, střevu, hypothalamu a thalamu.<sup>14</sup>

### 1.1.2.1 Metabolismus 17 $\beta$ -estradiolu

17 $\beta$ -estradiol prochází oxidativním metabolismem pomocí jaterních cytochromů P450. Hlavní cestou metabolismu estradiolu u lidí a jiných savců je aromatická hydroxylace na pozici C2 a C4. U lidí převažuje 2-hydroxylace nad 4-hydroxylací.<sup>17</sup> Hydroxylaci estradiolu na 2-hydroxyestradiol a/nebo 4-hydroxyestradiol katalyzují CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5. Methylyaci 2-hydroxyestradiolu a 4-hydroxyestradiolu katalyzuje katechol-O-methyltransferasa.<sup>18,19</sup> 16 $\alpha$ -hydroxylaci estradiolu na estriol katalyzují CYP1A2 a CYP3A4.<sup>20</sup> (Obr. 3) Estriol je glukuronidován na estriol-16-D-glukuronosid UDP-glukuronosyltransferasou (UGT2B11).<sup>21</sup> Jiné metabolické cesty estradiolu zahrnují tvorbu glukuronidových konjugátů a sulfataci. Přeměnu estradiolu na estradiol-3-glukuronid zajišťují UGT1A1, UGT1A10 a UGT2B28. Přeměnu estradiolu na 17 $\beta$ estra-1,3,5-trien-3,17-diol-3-sulfát zajišťují SULT1A1, SULT1A3, SULT1E1, SULT2A1.<sup>22</sup>



**Obr. 3:** Souhrn regionálně selektivní hydroxylace E2 15 lidskými isoformami CYP. Tučně označené isoformy CYP s vysokou aktivitou pro katalýzu dané metabolické reakce.

(převzato z <sup>18</sup>)

### 1.1.3 17 $\alpha$ -ethinylestradiol

17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) je syntetický hormon, derivát přírodního hormonu estradiolu (E2). EE2 je využíváný skoro ve všech moderních přípravcích kombinované hormonální perorální antikoncepce a je jedním z nejužívanějších léků vůbec. Je slabě rozpustný v ethanolu, ale relativně málo rozpustný ve vodě.<sup>23,24</sup> V lidském těle je vazebná afinita vůči estrogenovému receptoru 1-2 $\times$  vyšší než u E2. Tato vyšší hodnota afinity udává, že EE2 je ve srovnání s přírodním E2 mnohem silnější estrogení sloučeninou. Díky ethinylové skupině na C-17 je EE2 velice stabilní vůči oxidaci a vykazuje nejvyšší estrogenicitu v porovnání s ostatními estrogeny EE2 > E2 > E1.<sup>25</sup>

Za hlavní zdroj EE2 v odpadních vodách a životním prostředí je považována lidská moč. Před vyloučením močí je EE2 metabolizován tak, aby se stal neaktivním, ve vodě rozpustným konjugátem sulfátu nebo glukuronidu. Do životního prostředí se dostává EE2 také odpadními vodami z chovů hospodářských zvířat. Zde je EE2 používán ke zlepšení produktivity a léčení některých chorob hospodářských zvířat.<sup>26</sup> EE2 je v čistírnách odpadních vod částečně degradován, ale opětovně aktivován. Dále může být EE2 degradován působením UV v kombinaci s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, působením bakterií za aerobních podmínek a působením hub produkujících lignolitické enzymy.<sup>5,27</sup>

#### 1.1.3.1 *Metabolismus 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu*

Metabolismus EE2 byl vzhledem k tomu, že se jedná o endokrinní disruptor velice prozkoumán. Po vstupu do organismu je EE2 rozsáhle metabolizován. Oxidativní metabolismus byl studován na potkanech i lidech. EE2 je metabolizován především v játrech, kde je exprimováno hojné množství CYP.<sup>28,29</sup> EE2 je hydroxylován na 2, 4, 6 a 16 $\alpha$  pozici steroidního jádra, přičemž hlavní oxidační reakcí je 2-hydroxylace. Následně může být 2-hydroxy-EE2 methylován za vzniku 2-methoxyethinylestradiolu. Právě změny v 2-hydroxylaci mohou mít významný efekt na farmakokinetiku a efektivitu EE2 jako složky hormonální antikoncepce.<sup>30</sup>

Cytochromy P450, které převážně přispívají k 2-hydroxylaci EE2 v lidských mikrosomech jsou CYP2C9 a CYP3A4 a v menším rozsahu také CYP2C8, 2C19 a 1A2.<sup>31</sup> U potkanů přispívají k 2-hydroxylaci CYP2C a CYP2E a dávají vznik hlavnímu metabolitu EE2 2-hydroxy-EE2.<sup>32</sup> Potkaní CYP2A a CYP3A katalyzují hydroxylaci EE2 přednostně na jeho minoritní metabolit X-hydroxy-EE2, jehož struktura zatím nebyla identifikována.<sup>33</sup> Oxidace EE2 zahrnuje pouze malou část metabolismu EE2, následně probíhá glukuronizace na 17 a 3 pozici uridindifosfátglukuronyltransferasou 1A1, methylace nebo sulfatace na 3 pozici sulfotransferasou 1E1.<sup>29</sup> Další možné cesty EE2 metabolismu jsou a) D-homoanulace, přeskupení jedné ethinylové skupiny do D-kruhu EE2 za následného odstranění CO<sub>2</sub><sup>34</sup>, a b) odstranění ethinylové skupiny na C17.<sup>35</sup>

## **1.2 Biotransformační enzymy**

Za biotransformaci xenobiotik se považují procesy, které vedou ke snadnému odstranění polutantů z životního prostředí. Nejpočetnější skupinou enzymů oxidujících xenobiotika jsou monooxygenasy a dioxygenasy.<sup>36</sup> Tyto skupiny potřebují pro svou aktivitu molekulu kyslíku a kofaktor, který je schopný kyslík aktivovat (nejčastěji hemové či nehemové železo).<sup>37</sup>

### **1.2.1 Cytochromy P450**

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny, patřící mezi klíčové enzymy, které metabolizují cizorodé látky. Patří do skupiny mikrosomálních monooxygenas (oxidasy) se smíšenou funkcí. Vyskytují se především v játrech, dále pak v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány v membránách hladkého endoplazmatického retikula a v membránách mitochondrií. Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, porfyrinový skelet je vázán hydrofobními silami a prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, který se nachází v aktivním centru enzymu.<sup>37–39</sup> Struktura hemu je zobrazena na obrázku Obr. 4 na straně 17.



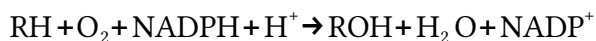


**Obr. 4:** Struktura hemu. Atomy kyslíku jsou zobrazeny červeně, dusíku modře a železo oranžově. (převzato z <sup>39)</sup>)

Cytochromy P450 jsou zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace chemických látek. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv.<sup>38</sup>

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoformy, isoenzymy). Řadí se do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. V současné době je popsáno přes 500 isoenzymů. Do stejné rodiny náleží CYP, u kterých se nachází 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, a do podrodiny se zařazují ty, které vykazují homologii více než 60%. Každý vyšší organismus má více forem CYP, v lidském genomu bylo identifikováno 43 forem cytochromu P450.<sup>40,41</sup>

Cytochrom P450 spolupůsobí s mikrosomální NADPH:CYP reduktasou. Většinu reakcí lze sumárně vyjádřit jako<sup>38</sup>:



## 1.2.2 Inhibitory CYP

Inhibitory cytochromů P450 mohou být rozděleny do tří odlišných tříd podle mechanismu: Látky které (a) se váží reversibilně, (b) tvoří kvazi-ireversibilní komplexy s atomem železa v hemu, (c) váží se ireversibilně na protein nebo hemovou část, nebo urychlují degradaci a/nebo fragmentaci prosthetického hemu.<sup>42,43</sup>

### 1.2.2.1 Reversibilní inhibitory

Reversibilní inhibitory CYP mohou být kompetitivní i nekompetitivní. Kompetitivní reversibilní inhibitory soutěží spolu se substrátem o obsazení aktivního místa a působí tak, že se a) váží na hydrofobní oblasti aktivního místa, b) koordinují s atomem železa v hemu, c) vstupují do specifických vodíkových vazeb nebo iontových interakcí s residui v aktivním místě.

### 1.2.2.2 Inhibice závislá na katalýze

U mnoha tříd sloučenin je známo, že prochází aktivací katalyzovanou CYP a přeměňují se na reaktivní meziprodukty, které ireversibilně nebo kvazi-ireversibilně inaktivují enzym zodpovědný za jejich aktivaci.

Jsou známy 4 základní třídy ireversibilních P450 inaktivátorů.

- 1) Agens, která se váží kovalentně na protein. Mezi ně patří sloučeniny obsahující síru (např. parathion, thiomočovina, isothiokyanaty, merkaptosteroidy), halogenované sloučeniny (např. choramfenikol), alkylované a arylované olefiny a acetyleny (např. 17 $\beta$ -ethynylprogesteron, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, gestoden), furanokumariny (např. 8-methoxypsoralen) a sloučeniny jako jsou karbamazepin a tamoxifen, které jsou hydroxylovány na katecholové metabolity.
- 2) Agens, která tvoří kvazi-ireversibilní vazby na atom železa prosthetického hemu. Dvě hlavní skupiny těchto inhibitorů jsou sloučeniny s dioxymethylenovou funkcí a dusíkaté sloučeniny, obvykle aminy přeměňované na nitroso metabolity.
- 3) Agens, která alkylují nebo aryloují porfyrinový skelet hemu. Např. terminální olefiny, acetyleny, dihydropyridiny, alkyl- a arylhydraziny a hydrazony.

4) Agens, která degradují prosthетický hem na produkty, které mohou v některých případech samy modifikovat protein. Např.  $\text{CCl}_4$ , spironolakton.

### 1.2.3 Cytochrom P450 1A1

Cytochrom P450 1A1 je enzym zapojující se do biotransformace mnoha léčiv a chemických sloučenin. CYP1A1 je enzym s monooxygenázovou aktivitou exprimovaný v extrahepatálních tkáních, především v tkáni plic, kůže, gastrointestinálního traktu, placenty, plodu a embrya.<sup>44</sup> Potkaní CYP1A1 má 80% totožnost v aminokyselinové sekvenci s lidským CYP1A1.<sup>45</sup>

Mezi endogenní substráty patří zánětlivé mediátory (kyselina arachidonová a kyselina eikosapentaenová), dále  $17\beta$ -estradiol a melatonin. CYP1A1 je znám především tím, že biotransformuje prokarcinogeny na karcinogení látky, například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH, z angl. polyaromatic hydrocarbons) a heterocyklické aromatické aminy (HAA, z angl. heterocyclic aromatic amines). Mezi PAH patří benzo[a]pyren (BaP) v tabákovém kouři a HAA se vyskytují ve spáleném mase a průmyslových arylaminech.<sup>46</sup> Metabolismus těchto kontaminantů zprostředkovaný cytochromem P450 1A1 může vést ke vzniku reaktivních metabolitů a vzniku DNA aduktů, které přispívají ke karcinogenezi a tím vzniku nádorů.<sup>47</sup>

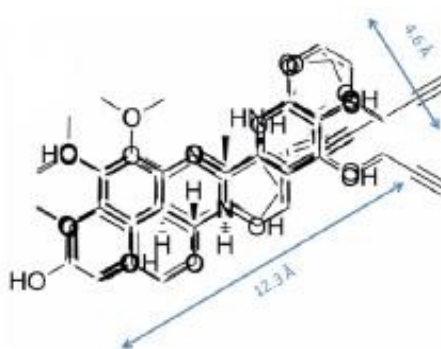
Indukce cytochromu P450 1A1 je zprostředkována pomocí aryluhlovodíkovového receptoru (AhR, z angl. aryl hydrocarbon receptor) skrz kaskádu kroků známých jako AhR signální dráha. Induktor překročí plasmatickou membránu a váže se na AhR, který je charakterizovaný jako „ligandem aktivovaný transkripční faktor“. AhR je obvykle přítomen v cytosolu v komplexu s dvěma Hsp90 proteiny (Hsp, z angl. Heat shock protein) a dalšími ještě nezcela identifikovanými proteiny. Hsp působí jako chaperonový systém, který zabraňuje transkripční aktivitě AhR, ale drží ho v konformaci, která umožní navázání ligandu. Po navázání ligandu se Hsp90 uvolní, AhR je spolu s navázaným ligadem translokován do jádra a váže se na svého partnera Arnt (Arnt, z angl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, AhR jaderný translokátor). Tento heterodimer interaguje s 5'-GCGTG-3' DNA sekvencí, která je

vazebným motivem XRE (XRE, z angl. xenobiotic responsive element, xenobiotikum rozpoznávající úseky DNA). Navázání AhR/Arnt vede ke změnám ve struktuře chromatinu umožňující transaktivaci genů řízených AhR.<sup>48,49</sup>

CYP1A1 je silně indukován u kuřáků, předpokládá se, že inducibilita tohoto enzymu koreluje se vznikem rakoviny plic.<sup>50</sup> Podle některých výzkumů je aktivita CYP1A1 indukována také v placentě kuřáček. Plod je tak vystaven potenciálně nebezpečnému množství metabolitů PAH.<sup>51</sup>

Tím, že CYP1A1 přeměňuje prokarcinogeny na karcinogeny, je kladen důraz na inhibici tohoto enzymu při vývoji preventivních a terapeutických činidel. Potenciální protirakovinné strategie zaměřené na inhibici CYP jsou postulovány takto: a) prevence přeměny environmentálních prokarcinogenů na karcinogeny, b) prevence přeměny hormonů na karcinogenní deriváty hormonů, c) prevence metabolické inaktivace protirakovinných léků.<sup>52,53</sup>

Mezi vysoce účinné skupiny inhibitorů patří polycyklické aromatické uhlovodíky, naftochinony a antrachinony, stilbeny, flavonoidy, kumariny, alkaloidy a léčiva. Jako inhibitory CYP1A1 bylo určeno 27 sloučenin. Berberin, palmatin, jatrorrhizin, rutecarpin, coriandrin, 7-ethinyl-3-phenylcoumarin, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, EIPA, 7-hydroxyflavon, isorhamnetin, 3'-propargyloxyflavon,  $\beta$ -naftoflavon, 4'-propargyloxy- $\beta$ -naftolfavon, 6,5-pyranoflavon, 2PPh, canabidiol, resveratrol, rhapontigenin, 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilben, oxyresveratrol, 3,4'-dimethoxy-5-hydroxystilben, 2,4,3',5'-tetramethoxystilben, 3,5,3',5'-tetramethoxystilben, 3,4,5,3',5'-pentamethoxystilben, 2-methoxy-4'-methylthiostilben, 2,3-dimethoxy-4'-methylthiostilben a 2,3,4-trimethoxy-4'-methylthiostilben. Proložením struktur těchto inhibitorů bylo dokázáno, že si jsou všechny struktury inhibitorů CYP1A1 podobné a vejdou se do dutiny aktivního místa CYP1A1. (Obr. 5, str. 21).<sup>53</sup>



**Obr. 5:** Struktury 27 inhibitorů CYP1A1 proložené přes sebe.  
(převzato z <sup>53</sup>)

#### 1.2.4 Cytochromy P450 3A1/2

Cytochromy CYP3A jsou jedny z nejdůležitějších isoform cytochromů P450 zodpovědných za metabolismus léčiv, zapojují se při oxidativní biotransformaci řad klinicky významných látek. Nachází se v gastrointestinálním traktu a játrech.<sup>54</sup> CYP3A1 a CYP3A2 se v těle potkana nachází pouze v játrech, přičemž CYP3A1 je hlavní potkaní CYP3A isoformou.<sup>55</sup> CYP3A1 a CYP3A2 sdílí 89% podobnost aminokyselinové sekvence a liší se ve 3 z 5 C-koncových aminokyselin.<sup>56</sup>

U člověka tvoří CYP3A4 30% celkového množství CYP v játrech. CYP3A4 katalyzuje metabolismus téměř 50 % léčiv, například cyklosporin A, terfenadin, mefenytoin, nifedipin, warfarin.<sup>57</sup>

Cytochromy P450 3A jsou indukovány pomocí nukleárního pregnanového X receptoru, PXR (z angl. pregnane X receptor). U člověka je analogem SXR, steroidní X receptor (z angl. steroid and xenobiotic receptor). PXR se skládá z N-terminální transaktivační domény (TAD, z angl. transactivation domain), následované DNA vazebnou doménou (DBD, z angl. DNA binding domain) a C-terminální vazebnou doménou ligandu (LBD, z angl. ligand binding domain). Ukázalo se, že pregnanové X receptory jsou druhově odlišné, DBD oblasti jsou z 95% sekvenčně identické, zatímco LBD oblasti jsou mnohem méně totožné a mají identitu aminokyselin 75-80%. Pravděpodobné rozdíly v regulaci CYP3A tudíž

vycházejí z rozdílů v LBD, neboť DBD je vysoce konzervativní mezi PXR různých druhů.<sup>58</sup> Myši PXR jsou indukovány dexamethasonem (DEX) a pregnenolonem-16 $\alpha$ -karbonitrilem (PCN). Potkaní PXR jsou aktivované DEX, PCN a nifedipinem (NIF). U člověka je SXR indukován DEX, PCN, NIF, ale také rifampicinem (RIF), klotrimazolem, progesteronem, estradiolem, kortikosteroidy a fenobarbitalem (PB).<sup>59</sup>

PXR je aktivován navázáním ligandu. PXR s navázaným induktorem tvoří dimer s retinoidním receptorem RXR (z angl. retinoid X receptor), dochází k jeho translokaci do jádra a k vazbě na PXR responzivní sekvence, specifické sekvence promotorové DNA, čímž se vyvolá transkripce těchto genů.<sup>60,61</sup>

Potkaní cytochrom P450 3A2 je indukován glukokortikoidy dexamethasonem (DEX) a pregnenolonem-16 $\alpha$ -karbonitrilem (PCN), zatímco CYP3A1 je indukován pouze PCN.<sup>62-64</sup>

Mezi známé inhibitory CYP3A1 a CYP3A2 patří diethyldithiokarbamát, ketonazol a klotrimazol.<sup>22,65</sup>

### 1.2.5 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na isoformy cytochromů P450

Navzdory tomu, že je estradiol hlavním endogenním estrogenem, je jeho efekt na expresi a aktivitu CYP stále velice neznámý.

#### 1.2.5.1 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na CYP1A1

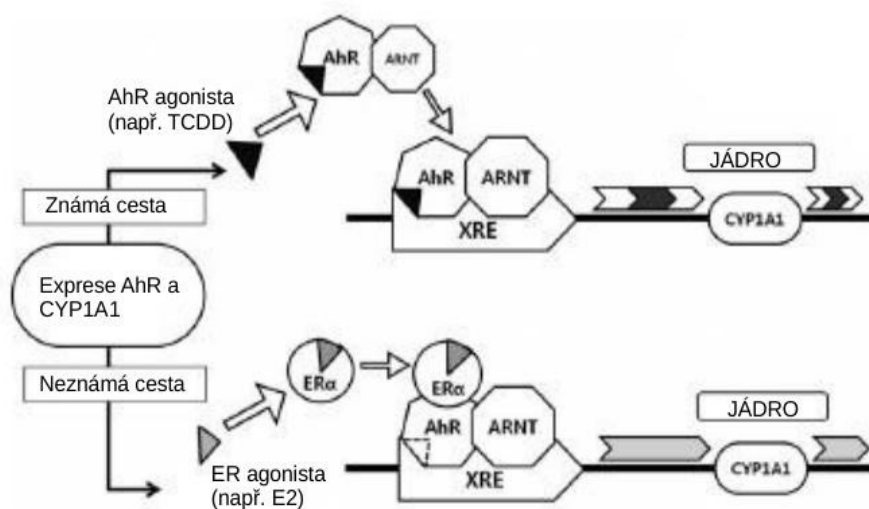
Cytochromy P450 1A1 hrají významnou roli při aktivaci prokarcinogenů (benzo[a]pyren, aflatoxin B1, tamoxifen, tabákově specifický nitrosamin) a mohou aktivovat 90% všech známých karcinogenů.<sup>40,50</sup> O CYP1A1 je známo, že hraje důležitou roli v proliferaci rakovinotvorných buněk v tkáních a orgánech exprimujících estrogenní receptory, včetně vaječníků a prsu.<sup>66</sup>

Existují 2 typy estrogenových receptorů – ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Oba estrogenové receptory si jsou velmi podobné, ER $\beta$  má více než 90% aminokyselinovou podobnost s ER $\alpha$  v DBD a přibližně 55% aminokyselinovou podobnost v LBD. 17 $\beta$ -estradiol se váže převážně na ER $\alpha$ .<sup>67</sup>

Mezi AhR a ER $\alpha$  byl pozorován „cross-talk“, jehož mechanismus není stále zcela znám a může být kombinací několika různých mechanismů. Tento „cross-talk“ byl pozorován na experimentech, které zkoumaly dlouhodobý účinek léčby TCDD (dioxin) na potkanech kmene Sprague Dawley. Mezi nálezy patřila pozorování, že incidence nádorů prsu a dělohy byla u samic potkanů snížena. Několik studií od té doby uvádí, že aktivovaný AhR inhibuje expresi 17 $\beta$ -estradiolem indukovaných genů.<sup>68</sup>

Snížení aktivity CYP1A1 je závislá na typu buňky. MCF-7 buňky v prsní tkáni a ECC-1 buňky endometria vykazovaly výrazné snížení CYP1A1 aktivity v přítomnosti 17 $\beta$ -estradiolu na rozdíl od jaterních buněk Hep-3B a buněk keratinocytů HuE. Snížení enzymové aktivity vzájemně souvisí se sníženými hladinami mRNA a transkripcí. ER $\alpha$  s navázaným E2 se váže na aktivní AhR, tvoří komplex Arnt. Vzniká komplex ER $\alpha$ -AhR-Arnt, navázaný na XRE, který moduluje expresi DNA.<sup>69</sup> Ukázalo se, že v nepřítomnosti 17 $\beta$ -estradiolu, TCDD navázaný na AhR, přijímá ER $\alpha$  do AhR regulovaných genů CYP1A1. Toto spojení pravděpodobně nastává přímými protein-proteinovými interakcemi mezi AhR a ER $\alpha$ .<sup>68</sup> (Obr. 6, str. 24)

Význam E2 a ER při aktivaci CYP1A1 je velký, protože by se mohla cíleně začít vyrábět více efektivní protirakovinová léčiva.<sup>66</sup>



**Obr. 6:** Spolupráce E2 a ER s AhR při indukci exprese CYP1A1 v MCF-7 CV buňkách citlivých na estrogen. (převzato a upraveno z <sup>66</sup>)

Vliv E2 a EE2 na relativní míru genové exprese byl sledován v játrech, ledvinách a plicích potkanů. U potkanů premedikovaných E2 i EE2 byla relativní míra genové exprese snížena.<sup>70</sup>

Tvorba kovalentních DNA aduktů odvozených od benzo[a]pyrenu byla sledována po vystavení potkanů BaP v kombinacích s E2 nebo EE2 *in vivo*. Výsledky ukazovaly, že tvorba kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP je působením E2 a EE2 snížena. Toto snížení je zřejmě způsobeno tím, že E2 a EE2 ovlivňují metabolismus BaP, což vede ke snížené tvorbě kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP.

Vliv E2 a EE2 na tvorbu kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP byl sledován také *in vitro*. V tomto případě byla tvorba DNA aduktů vlivem E2 a EE2 také snížena. Toto snížení je zřejmě způsobeno tím, že E2 a EE2 inhibují aktivitu CYP1A1, který zprostředkovává oxidační aktivaci BaP.<sup>70</sup>



#### **1.2.5.2 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na CYP3A1/2**

Řada výzkumníků zkoumala účinky E2 na expresi jaterních CYP u potkanů. Tyto studie byly zaměřeny především na isoformy CYP, které vykazují sexuální dimorfismus, jako je CYP3A2. Mezi hlavní CYP3A potkaních samic patří CYP3A1 a CYP3A9, CYP3A2 je u samic exprimován ve velmi malém množství. Ukázalo se, že E2 zvyšuje expresi CYP3A9, zatímco exprese CYP3A1 byla snížena. Tento jev může být přičítán tomu, že dochází ke snížení exprese PXR, což je klíčový transkripční faktor při modulaci exprese CYP3A1.<sup>71</sup>

Expresa CYP3A2 byla sledována pro objasnění vztahů mezi žludečným 17 $\beta$ -estradiolem, metabolismem jaterních estrogeních receptorů a cholesterolem u potkaních samců po podvázání žlučových (BDL, z angl. Bile duct ligation). Po podvázání žlučových byla exprese jaterní ER $\alpha$ -mRNA snížena a hodnoty E2 v portální žíle stouply téměř 5 $\times$ . Relativní míra genové exprese jaterního CYP3A2 samců byla snížena vlivem zvýšených hodnot E2.<sup>72</sup>

Vliv na expresi a aktivitu CYP3A1 byl sledován u potkanů premedikovaných E2 a jeho kombinací s EE2. Bylo zjištěno, že exprese CYP3A1/2 v játrech je snížena u potkanů premedikovaných E2 i EE2. V ledvinách je exprese CYP3A1/2 po vystavení těmto kombinacím EDC snížena jen velmi mírně.<sup>73</sup>

Aktivita CYP3A1/2 byla sledována v játrech premedikovaných potkanů. Zde byla hodnota aktivity, sledována pomocí 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu, po vystavení E2 snížena.<sup>74</sup>

#### **1.2.5.3 Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na další isoformy cytochromu P450**

17 $\beta$ -estradiol ovlivňuje aktivitu i jiných cytochromů P450. CYP1B1 spolu s CYP1A1 katalyzuje oxidativní metabolismus 17 $\beta$ -estradiolu na katecholové estrogeny (2-OHE2 a 4-OHE2) a estrogení chinony, které mohou vést k poškození DNA. Katechol-O-methyltransferasa inaktivuje katecholové estrogeny O-demethylací za vzniku methoxyestrogenů. Ukázalo se, že methoxyestrogeny inhibují CYP1B1 zpětnou vazbou stejně jako CYP1A2 a CYP3A4. Jelikož se tyto cytochromy hrají klíčovou roli v I. fázi biotransformace

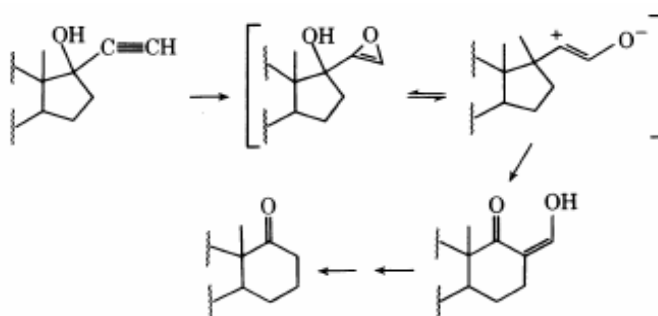
xenobiotik, může jejich inhibice methoxyestrogeny představovat fyziologický obranný mechanismus proti karcinogenezi.<sup>19</sup>

### 1.2.6 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na isoformy CYP

17 $\alpha$ -ethinylestradiol je reversibilní a časově závislý inhibitor několika cytochromů P450 v lidském těle, například: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP3A4 a CYP3A5.<sup>75</sup>

Inkorporace ethinylové skupiny do molekuly estradiolu vede ke zvýšení kvality účinku při podávání léků perorálně.

EE2 obsahuje ethinylovou skupinu, o které se ukázalo, že způsobuje mechanismus inaktivace CYP. Ten je vyvolaný přímým přenosem elektronů mezi ethinylovou skupinou a hemem na základě přenosu elektronů z nenasycených vazeb na metaloporfiriny. Klíčem k tomuto mechanismu jsou produkty vytvářené oxidačním mechanismem ethinylové skupiny na D-kruhu 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu. Během oxidace ethinylové skupiny dochází ke vzniku velmi nestabilního a reaktivního ethinyloxidu, silnému nukleofilu, který se kovalentně váže na CYP, což vede k inaktivaci enzymu zahrnující buď destrukci hemu nebo modifikaci apoproteinu.<sup>76,77</sup> (Obr. 7)



**Obr. 7:** Oxidace steroidního D-kruhu. Přenos kyslíku z CYP na ethinylovou část vede ke vzniku oxirenového intermediátu a následně ke vzniku D-homoketonů nebo alkoholů. Tímto je prostetická skupina cytochromu P450 alkylována a vzniká struktura s nižší energií. (převzato z <sup>77</sup>)

#### 1.2.6.1 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na CYP1A1

17 $\alpha$ -ethinylestradiol prochází hydroxylací na 2, 4, 6 a 16 $\alpha$  pozici steroidního jádra, přičemž 2-hydroxylace je hlavní oxidativní reakcí.<sup>78</sup> Ukázalo se, že rekombinantní CYP1A1, především extrahepatální, vykazuje vyšší katalytickou aktivitu pro 2-hydroxylaci EE2 než CYP3A4 a CYP2C9.<sup>31</sup> U některých CYP bylo prokázáno, že katalyzují oxidaci EE2 na prozatím neznámý X-hydroxy-EE2, přičemž CYP1A1 EE2 na tento produkt metabolizuje nejúčinněji.<sup>79</sup>

17 $\alpha$ -ethinylestradiol je silným kompetitivním inhibitorem CYP1A1. Jako inhibitory lidského rCYP1A1 byly také prokázány čtyři metabolity EE2 (EE2 3-O-sulfát, EE2 3-O-glukuronid, 2-hydroxyEE2, 3-methoxyEE2).<sup>75</sup>

Vliv EE2 na expresi v játrech, ledvinách a plicích byl sledován spolu s 17 $\beta$ -estradiolem. Relativní míra genové exprese byla vlivem EE2 i E2 snížena.

Tvorba kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP byla sledována po premedikaci potkanů BaP v kombinacích s E2 nebo EE2 *in vivo*. Výsledky ukázaly, že tvorba kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP je působením EE2 i E2 snížena. Toto snížení je zřejmě způsobeno tím, že E2 a EE2 ovlivňují metabolismus BaP, což vede ke sníženému vzniku kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP.

Vliv E2 a EE2 na tvorbu kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP byl sledován také *in vitro*. V tomto případě byla tvorba DNA aduktů vlivem EE2 i E2 také snížena. Toto snížení je zřejmě způsobeno tím, že E2 a EE2 inhibují aktivitu CYP1A1, který zprostředkovává oxidační aktivaci BaP.<sup>70</sup>

#### **1.2.6.2 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na CYP3A1/2**

CYP3A1 a CYP3A2 jako CYP1A1 katalyzují 2-hydroxylaci EE2 a oxidaci EE2 na prozatím neznámý metabolit X-hydroxy-EE2.<sup>79</sup>

Expresa CYP3A byla sledována v játrech a ledvinách potkanů v přítomnosti E2, EE2 a BaP. Relativní míra genové exprese v játrech i ledvinách byla u potkanů premedikovaných EE2 snížena jen velmi mírně. U potkanů premedikovaných E2 spolu s EE2 došlo k výraznějšímu snížení genové exprese v játrech i ledvinách.<sup>73</sup>

Aktivitu CYP3A je možné sledovat markerovými reakcemi 6 $\beta$ -hydroxylací testosteronu a progesteronu. Zkoumalo se, zda je inhibitorem EE2, či produkt vzniklý při preinkubaci s NADPH. Ukázalo se, že aktivita CYP3A sledovaná 6 $\beta$ -hydroxylací progesteronu je v obou případech srovnatelná. U 6 $\beta$ -hydroxylace TST tomu však bylo naopak, ukázalo se, že vznikají metabolity EE2, které inhibují 6 $\beta$ -hydroxylaci TST. Dá se tedy říci, že EE2 inhibuje 6 $\beta$ -hydroxylaci progesteronu katalyzovanou CYP3A jako reversibilní inhibitor, ale v případě 6 $\beta$ -hydroxylace TST způsobují inhibici CYP3A reaktivní meziprodukty EE2.<sup>33</sup>

#### **1.2.6.3 Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na další isoformy cytochromu P450**

V mnoha studiích *in vitro* se ukázalo, že EE2 způsobuje inhibici několika CYP a může ovlivnit interakci mezi léky. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol působí jako sebevražedný substrát CYP3A4, 2B1 a 2B6.<sup>80,81</sup> Ztráta aktivity v případě CYP3A4 je způsobena modifikací hemu, zatímco CYP2B1 a CYP2B6 je inaktivován díky vazbě kovalentního ethinyloxidu na apoprotein.<sup>30</sup> Slabá reversibilní inhibice 17 $\alpha$ -ethinylestradiolem byla zjištěna také u CYP2C19 a CYP2C8.<sup>82,83</sup>

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu endokrinních disruptorů  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních CYP1A1 a CYP3A1. Tato práce je součástí rozsáhlejší studie řešené v rámci grantového projektu: „Organismy a mechanismy určující osud endokrinních disruptorů v životním prostředí.“

Hlavní cíl této práce byl:

- Nalezení optimální koncentrace cytochromu P450 pro měření aktivity potkaních CYP1A1 a CYP3A1.
- Měření specifické enzymové aktivity potkaních CYP1A1 a CYP3A1 bez a za přítomnosti  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu.
- Určení  $IC_{50}$  studovaných estrogenů.

### **3 MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 Použité chemikálie a rozpouštědla**

Chemikálie a rozpouštědla použitá v předkládané bakalářské práci pocházejí z následujících zdrojů:

**Biomol GmbH, Německo:** NADPH

**Cayman Chemicals, USA:** 6 $\beta$ -hydroxytestosteron

**Fluka, Švýcarsko:** testosteron

**Gentest BD Bioscience, USA:** potkaní rekombinantní CYP1A1 a CYP3A1 v Supersomech<sup>TM</sup>

**Lach:Ner, ČR:** DMSO, ethylacetát, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, methanol, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, NaCl

**Lachema, ČR:** Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Linde, ČR:** kapalný dusík

**Sigma-Aldrich, USA:** estradiol, ethinylestradiol, 7-ethoxyresorufin, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, resorufin

**VWR Chemicals, Francie:** methanol (HPLC)

### **3.2 Použité přístroje**

#### **Analytické váhy:**

40SM-200A, Pesa, Švýcarsko

Discovery, Ohaus, USA

#### **Automatické pipety:**

Eppendorf, Německo

Nichiryo Nichipet ex, Japonsko

#### **Centrifugy:**

Centrifuga 5418, úhlový rotor, Eppendorf, Německo

Minicentrifuga Spectrafuge™, úhlový rotor, Labnet, USA

#### **Filtrační zařízení na mobilní fáze:**

Millipore® Stericup™ filtration system, Sigma-Aldrich, USA

#### **HPLC systém:**

HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, USA

Pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detektor UVD 170S/340S

Degasys DG-1210 Dionex

Termobox pro kolonu: LCO 101, ECOM, ČR

Předkolona: Nukleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Německo

Kolona: Nukleosil 100-5 C18 – 250/4, Macherey-Nagel, Německo

Program: Chromeleon™ 6.11 build 490

#### **Inkubátor:**

Thermomixer Compact, Eppendorf, Německo

**Magnetická míchačka:**

Variomag, Monotherm, Německo

**Předvážky:**

EW 600-2M, Kern, Německo

**Spektrofotometr:**

Infinite M200 PRO Multimode Microplate Reader, TECAN, Švýcarsko

**Vakuová oparka:**

CentriVap Benchtop vakuum concentrator, LABCONCO, USA

**Vortex:**

MS1 Minishaker, IKA, USA

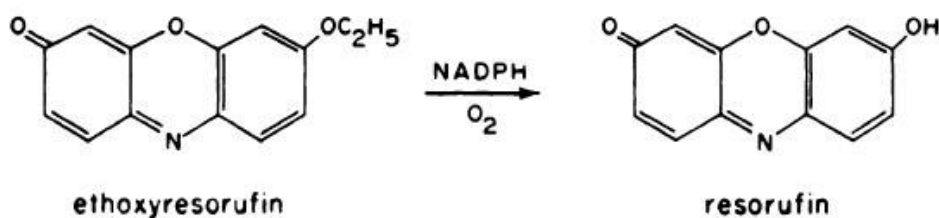
Vortex Mixer VX-200, Labnet, USA



### 3.3 Použité metody

#### 3.3.1 Stanovení aktivity CYP1A1 – O-deethylace 7-ethoxyresorufinu

7-ethoxyresorufin je markerovým substrátem CYP1A1 (částečně také CYP1A2 a CYP1B1). O-deethylace 7-ethoxyresorufinu (Obr. 8) byla proto použita jako markerová reakce pro sledování aktivity CYP1A1. Při této reakci dochází ke vzniku fluorescenčního produktu resorufinu. Díky přímé úměrnosti mezi intenzitou fluorescenčního záření a koncentrací látky, lze stanovit množství vznikajícího resorufinu.<sup>84</sup>



**Obr. 8:** O-deethylace 7-ethoxyresorufinu. (převzato z <sup>84</sup>)

Pro stanovení O-deethylační aktivity byly použity Supersomy<sup>TM</sup>, což jsou hmyzí buňky infikované bakulovirem, exprimující potkaní CYP1A1.

Nejprve byla vytvořena kalibrační křivka pro různá látková množství resorufinu. Jako standard byly použity roztoky resorufinu v pufru o koncentracích v rozmezí od 0 – 2  $\mu\text{M}$ . Z kalibrační křivky bylo při stanovení O-deethylace 7-ethoxyresorufinu vypočteno látkové množství vznikajícího resorufinu ve vzorcích.

Byl sledován vliv E2 a EE2 o koncentracích odpovídajících 100 $\times$ ; 10 $\times$ ; 5 $\times$ ; 2 $\times$ ; 1 $\times$ ; 0,5 $\times$ ; 0,2 $\times$  a 0,1 $\times$  koncentraci substrátu 7-ethoxyresorufinu. Paralelně byla měřena aktivita CYP1A1 bez přidavku inhibitoru, místo roztoku inhibitoru bylo přidáváno rozpouštědlo DMSO. Objem DMSO nesměl přesáhnout 1 % celkového objemu inkubační směsi.

Následně byly připraveny inkubační směsi o složení:

- 0,005 nmol/ml cytochrom P450 1A1 (2 nmol/ml v Supersomech<sup>TM</sup>)
- 2  $\mu$ M 7-ethoxyresorufin (0,4mM zásobní roztok v DMSO)
- 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztoky v DMSO)
- 100 mM fosfátový pufr (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH = 7,4)
- 1mM NADPH (10mM zásobní roztok)

Supersomy byly naředěny pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence způsobený tvorbou resorufinu byl v čase lineární. Inkubační směs ve zkumavkách Eppendorf, připravená pro čtyři paralelní měření, obsahovala všechny složky kromě NADPH a byla inkubována 10 minut při 37°C. Poté byla rozpipetována do 4 jamek mikrotitrační destičky po 180  $\mu$ l. Ve třech jamkách byla reakce startována 20  $\mu$ l 10mM NADPH, zatímco do směsi ve čtvrté jamce, která sloužila jako „blank“, bylo přidáno stejné množství pufru.

Okamžitě byla měřena fluorescence po dobu 3 minut v intervalech 0,5 minuty při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství vznikajícího resorufinu za minutu na 1 pmol cytochromu P450 1A1. Vždy byla porovnána aktivita CYP1A1 po přidání E2 nebo EE2 s aktivitou CYP1A1 po přidání DMSO. Tato aktivita představovala 100% aktivitu CYP1A1 a díky ní byla vypočítána procentuální inhibice způsobená 17 $\beta$ -estradiolem a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolem. Pro každý inhibitor byla vytvořena závislost logaritmu koncentrace inhibitoru na procentuální inhibici CYP1A1. Tato závislost byla proložena křivkou popsanou rovnicí pro výpočet IC<sub>50</sub><sup>85</sup>. Z této křivky byla poté odečtena hodnota pro 50% inhibici.

V rámci sledování vlivu E2 a EE2 na aktivitu CYP1A1, bylo zjišťováno, zda aktivitu CYP1A1 snižují metabolity E2 nebo EE2 vzniklé při preinkubaci. V tomto případě bylo měření stejné, pouze se připravila preinkubační směs o složení: pufr, Supersomy<sup>TM</sup>, inhibitor a NADPH, a reakce byla startována substrátem 7-ethoxyresorufinem.

### 3.3.2 Stanovení aktivity CYP3A1/2 – 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu

#### 3.3.2.1 Příprava inkubační směsi

Pro studium aktivity CYP3A1 byla použita metoda 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu<sup>86</sup>. Použity byly Supersomy<sup>TM</sup> exprimující potkaní CYP3A1.

Reakční směsi o celkovém objemu 500  $\mu$ l byly připraveny do zkumavek Eppendorf v tripletech o následujícím složení:

- 10 pmol cytochrom P450 3A1 (1 nmol/ml v Supersomech<sup>TM</sup>)
- 50  $\mu$ M testosteron (10mM zásobní roztok v metanolu)
- 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethinylestradiol o příslušné koncentraci (zásobní roztoky v DMSO)
- Dimethylsulfoxid
- 100mM fosfátový pufr (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH = 7,4)
- 50  $\mu$ l NADPH-generující systém (zásobní roztok: 1mM NADP<sup>+</sup>, 10mM D-glukosa-6-fosfát, 1 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 10mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)

Supersomy<sup>TM</sup> byly naředěny tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst tvorby testosteronu byl v čase lineární. Tato lineární závislost byla ověřena tím, že byly vzorky preinkubovány po dobu 5, 10 a 15 minut.

Byl sledován vliv E2 a EE2 o koncentracích vyšších (10 $\times$ ; 5 $\times$ ; 2 $\times$ ; 1 $\times$ ; 0,5 $\times$ ; 0,2 $\times$  a 0,1 $\times$ ; v případě E2 i 0,01 $\times$ ) než byla koncentrace substrátu, testosteronu. Současně byla měřena také aktivita CYP3A1 bez přídavku inhibitoru, zde bylo přidáno stejné množství rozpouštědla DMSO. Objem DMSO nesměl přesáhnout 1 % celkového objemu inkubační směsi. Dále byly připraveny kontrolní reakční směsi, které neobsahovaly buď Supersomy<sup>TM</sup> nebo NADPH-generující systém. Reakční směsi byly preinkubovány při 37°C po dobu 5 minut bez přítomnosti GS.

Reakce byla zahájena přidáním 50  $\mu$ l GS a vzorky byly inkubovány za přístupu vzduchu po dobu 15 minut (37°C, 400 RPM). Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu$ l roztoku 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/2M NaCl a vzorky byly 10 sekund vortexovány. Dále bylo do reakční směsi přidáno 5  $\mu$ l fenacetinu (1 mM v methanolu) a 1 ml ethylacetátu. Po intenzivním třepání

(2 minuty, 1400 RPM) byly obě fáze odděleny centrifugací při 13 000 RPM po dobu 5 minut. Organická fáze byla odebrána do čisté vialky a odpařena do sucha ve vakuové odparce. Extrakce byla provedena dvakrát. Před separací na HPLC byly vzorky rozpuštěny v 30  $\mu$ l methanolu o vysoké čistotě.

### ***3.3.2.2 Separace 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií***

Metabolit testosteronu 6 $\beta$ -hydroxytestosteron vzniklý reakcí v inkubačních směsích byl separován a kvantifikován metodou HPLC za použití lineárního gradientu 0-100% mobilní fáze B po dobu 27 minut. Mobilní fáze A byla tvořena 50% (v/v) methanolem, mobilní fáze B 75% (v/v) methanolem. Separace byla provedena na koloně Nucleosil 100-5 C18, 250  $\times$  4 mm při teplotě 35°C s konstantní průtokovou rychlostí 0,6 ml/min. 6 $\beta$ -hydroxytestosteron byl detekován při vlnové délce 254 nm a kvantifikován vztahem plochy jeho píku k ploše píku vnitřního standardu (fenacetin).

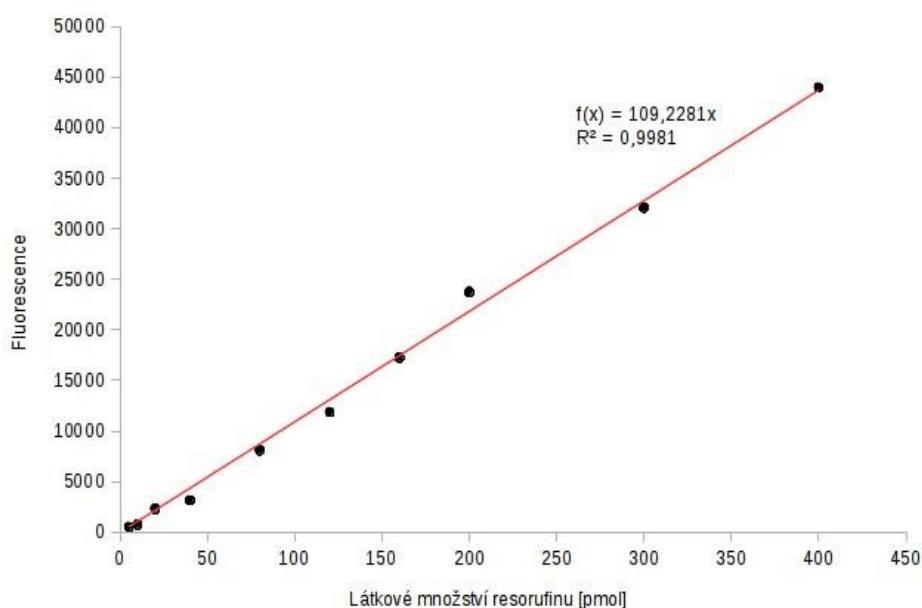
Vyhodnocení bylo provedeno za použití šestibodové kalibrační přímky o rozsahu 10 až 500  $\mu$ mol/l 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu, odezvy byly také vztaheny na plochu vnitřního standardu. Nástřik na kolonu činil 20  $\mu$ l. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství vznikajícího 6 $\beta$ -hydroxytestosteronu za minutu na 1 pmol cytochromu P450 3A1. Vždy byla porovnávána aktivita CYP1A1 po přidání E2 nebo EE2 s aktivitou CYP3A1 po přidání DMSO, která představovala 100% aktivitu CYP1A1 a díky ní byla vypočítána procentuální inhibice způsobená 17 $\beta$ -estradiolem a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolem. Pro každý inhibitor byla vytvořena závislost logaritmu koncentrace inhibitoru na procentuální inhibici CYP3A1. Tato závislost byla proložena křivkou popsanou rovnicí pro výpočet IC<sub>50</sub>.<sup>85</sup> Z této křivky byla poté odečtena hodnota pro 50% inhibici.

## 4 VÝSLEDKY

Tato předkládaná práce se zabývá vlivem endokrinních disruptorů  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních CYP1A1 a CYP3A1.

### 4.1 Vliv $17\beta$ -estradiolu a $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1

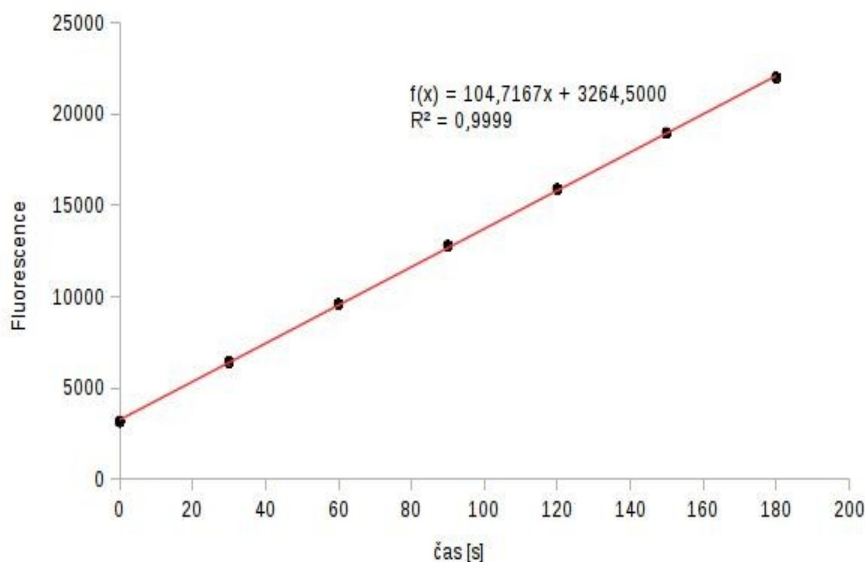
Specifická aktivita cytochromu P450 1A1 byla stanovena měřením *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu<sup>84</sup>. CYP1A1 katalyzuje přeměnu 7-ethoxyresorufinu na resorufin, který stanovujeme fluorescenční spektroskopií při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Pro toto stanovení byl použit potkaní CYP1A1 exprimovaný v Supersomech<sup>TM</sup>. Nejprve byla sestrojena kalibrační přímka odezvy fluorescence na látkové množství resorufinu (Obr. 9).



**Obr. 9:** Závislost fluorescence na látkovém množství resorufinu – kalibrační přímka.

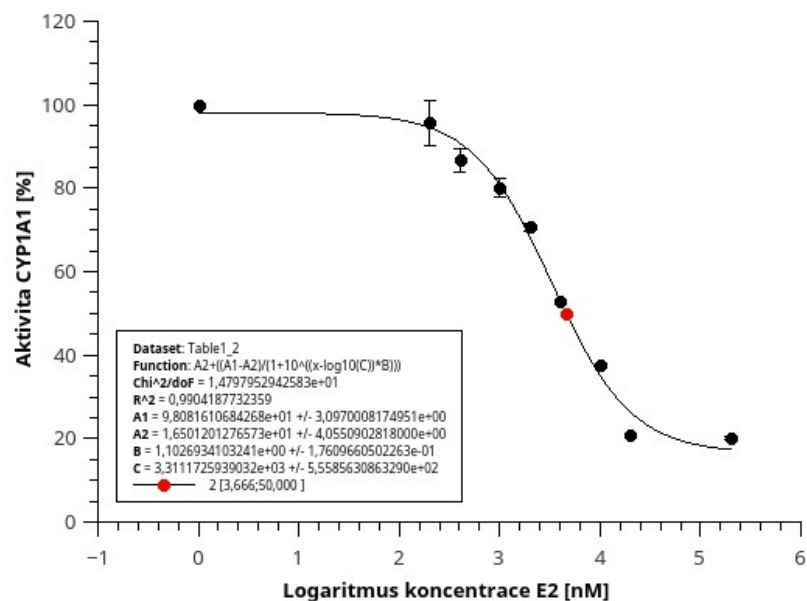
Použité koncentrace resorufinu: 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5; 2  $\mu$ M.

Dále byla nalezena optimální koncentrace cytochromu P450 1A1, při které rychlost tvorby produktu (resorufinu) probíhala kinetikou 0. řádu (Obr. 10). Intenzita fluorescence byla měřena po nastartování reakce po dobu 3 minut v intervalech 0,5 minut. Byly vyzkoušeny koncentrace cytochromu P450 1A1 0,5 pmol/ml; 2,5 pmol/ml; 5 pmol/ml a 25 pmol/ml. Hodnota optimální koncentrace CYP1A1 byla 0,005 nmol/ml.

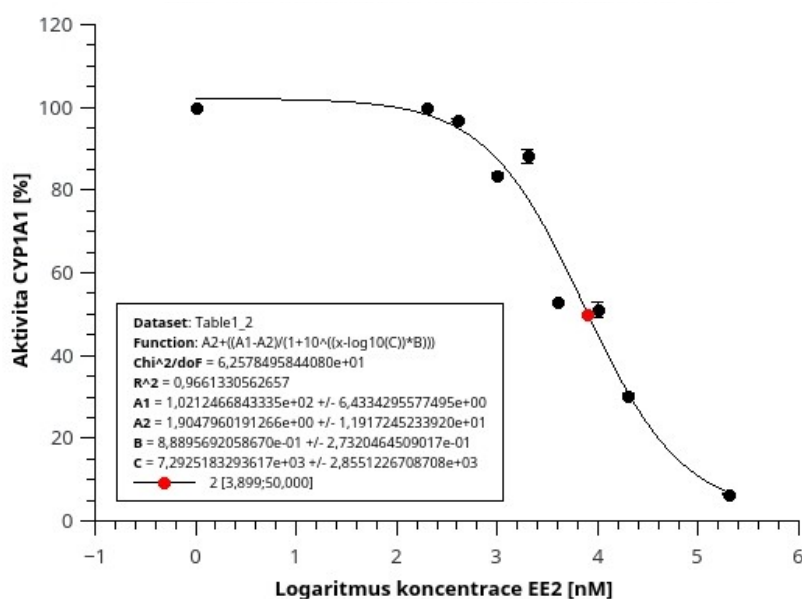


**Obr. 10:** Závislost intenzity fluorescence na čase měřená při optimální koncentraci CYP1A1 (5 pmol/ml) v inkubační směsi (excitační vlnová délka 530 nm a emisní vlnová délka 585 nm).

Pro stanovení schopnosti  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu inhibovat aktivitu CYP1A1 byla měřena míra *O*-deethylasové aktivity CYP pro různé koncentrace E2 a EE2. Výsledná koncentrace  $17\beta$ -estradiolu i  $17\alpha$ -ethinylestradiolu v reakční směsi byla v obou případech 0,2 – 200  $\mu$ M. Koncentrace substrátu 7-ethoxyresorufinu byla 2  $\mu$ M. Aktivity CYP1A1 v přítomnosti estrogenů byly porovnány s kontrolní aktivitou CYP1A1 bez přidavku inhibitoru a následně byly vyneseny do grafu (Obr. 11 a Obr. 12 na str. 39). Body grafu byly v programu QtiPlot proloženy rovnicí pro vyhodnocení koncentrace  $IC_{50}$ .<sup>85</sup> Tato hodnota byla poté z proložené křivky odečtena. Pro  $17\beta$ -estradiol byla tato hodnota koncentrace  $IC_{50}(\text{CYP1A1}) = 4,6 \mu\text{M}$  a pro  $17\alpha$ -ethinylestradiol  $IC_{50}(\text{CYP1A1}) = 7,9 \mu\text{M}$ .

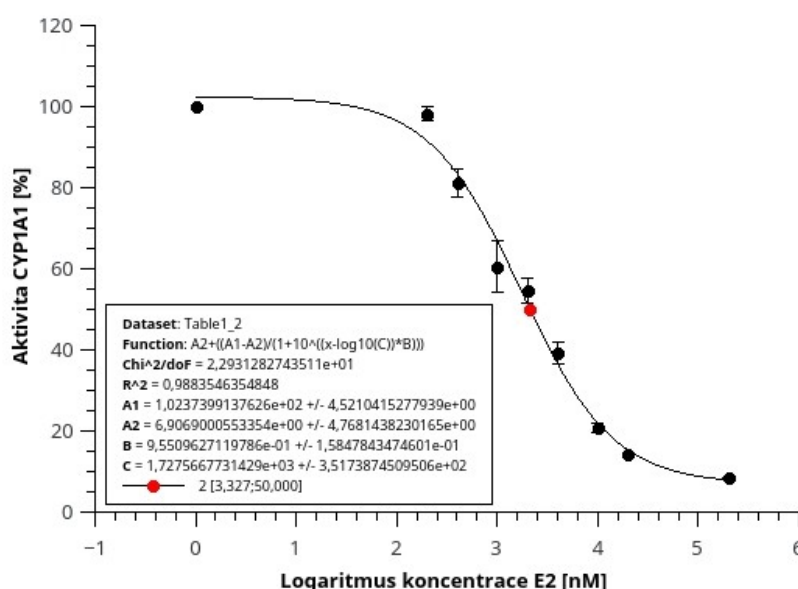


**Obr. 11:** Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP1A1 v Supersomech™. Závislost aktivity CYP1A1 na logaritmu koncentrace 17 $\beta$ -estradiolu. Inhibice aktivity CYP1A1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přidavku inhibitoru. Aktivita CYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu.



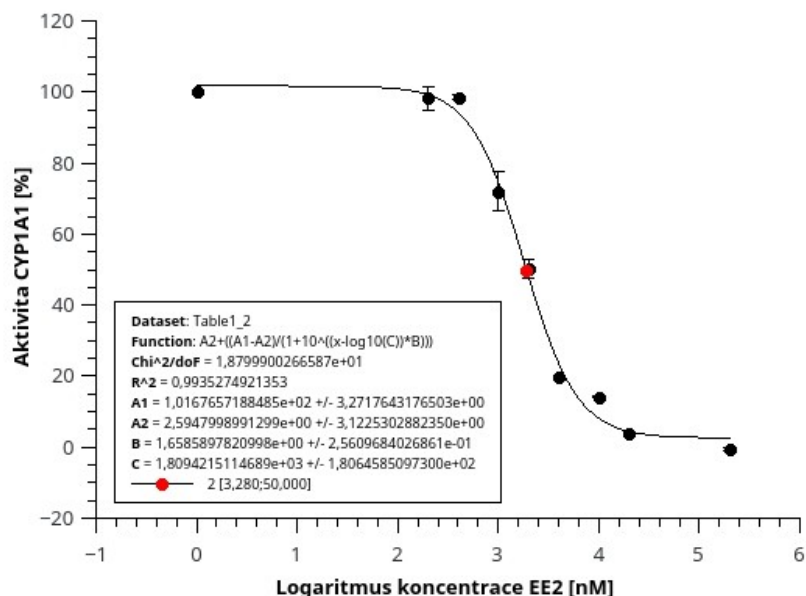
**Obr. 12:** Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP1A1 v Supersomech™. Závislost aktivity CYP1A1 na logaritmu koncentrace 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu. Inhibice aktivity CYP1A1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přidavku inhibitoru. Aktivita CYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu.

Následně bylo stejným způsobem sledováno, zda aktivitu CYP1A1 nesnižují metabolity E2 nebo EE2 vzniklé při preinkubaci estrogenů s NADPH, kofaktorem cytochromů P450. Jednotlivé aktivity CYP1A1 byly porovnány s kontrolní aktivitou CYP1A1 bez přidavku inhibitoru a poté byly vyneseny do grafu (Obr.13 a Obr. 14 na str. 41). Pro oba estrogeny byla nalezena hodnota koncentrace způsobující 50% inhibici. Pro 17 $\beta$ -estradiol  $IC_{50}(\text{CYP1A1}) = 2,1 \mu\text{M}$  a 17 $\alpha$ -etiňylestradiol  $IC_{50}(\text{CYP1A1}) = 1,9 \mu\text{M}$ . V obou případech bylo pozorováno, že aktivita CYP1A1 po preinkubaci estrogenů s NADPH byla nižší než po preinkubaci bez NADPH.



**Obr. 13:** Vliv 17 $\beta$ -estradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup> po preinkubaci E2 s NADPH. Závislost aktivity CYP1A1 na logaritmu koncentrace 17 $\beta$ -estradiolu. Inhibice aktivity CYP1A1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přidavku inhibitoru. Aktivita CYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu.



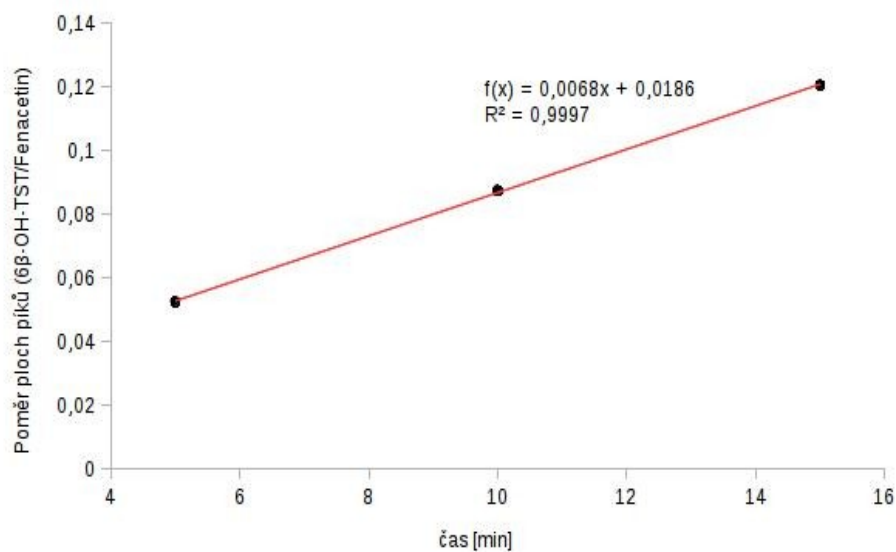


**Obr. 14:** Vliv  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP1A1 v Supersomech<sup>TM</sup> po preinkubaci EE2 s NADPH. Závislost aktivity CYP1A1 na logaritmu koncentrace  $17\alpha$ -ethinylestradiolu. Inhibice aktivity CYP1A1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přídavku inhibitoru. Aktivita CYP1A1 byla stanovena reakcí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu.

## 4.2 Vliv $17\beta$ -estradiolu a $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP3A1

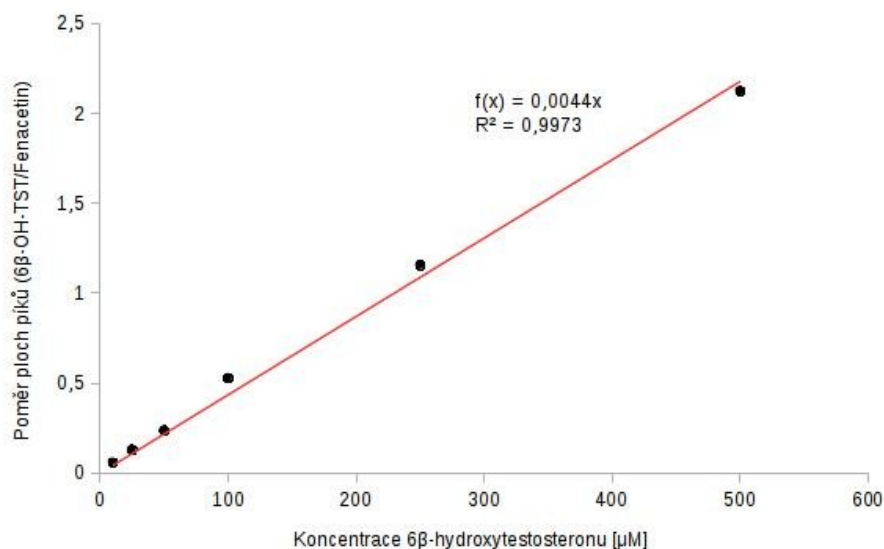
Aktivita cytochromu P450 3A1 byla určována pomocí markerové reakce, kterou je  $6\beta$ -hydroxylace testosteronu<sup>86</sup>. Detekce substrátu, produktu i standardu (fenacetin) byla provedena měřením absorbance při 254 nm po rozdělení inkubační směsi metodou HPLC. Pro toto stanovení byly použity potkaní CYP3A1 exprimované v Supersomech<sup>TM</sup>.

Nejprve byla nalezena optimální koncentrace cytochromu P450 3A1, při které vznik produktu ( $6\beta$ -hydroxytestosteronu) probíhal kinetikou 0. řádu (Obr. 15 na str. 42). Byly vyzkoušeny koncentrace cytochromu P450 3A1 2 pmol/ml a 20 pmol/ml. Hodnota optimální koncentrace byla 20 pmol/ml CYP3A1. Tato lineární závislost byla ověřena tím, že byly vzorky preinkubovány po dobu 5, 10 a 15 minut. Fenacetin, testosteron i  $6\beta$ -hydroxytestosteron byl detekován při 254 nm.



**Obr. 15:** Závislost plochy píkú metabolitu 6β-hydroxytestosteronu na čase při optimální koncentraci CYP3A1 20 pmol/ml. Absorbance byla měřena při 254 nm.

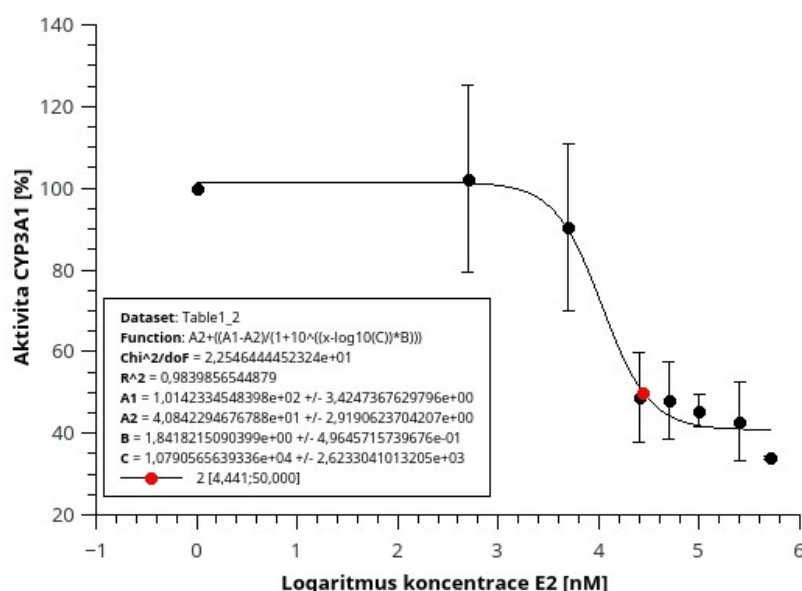
Následně byla sestrojena šestibodová kalibrační přímka závislosti plochy píkú metabolitu 6β-hydroxytestosteronu na koncentraci 6β-hydroxytestosteronu o rozsahu od 0 do 500 μM (Obr. 16).



**Obr. 16:** Kalibrační řada 6β-hydroxytestosteronu. Plocha píku 6β-hydroxytestosteronu byla standardizována na fenacetin. Absorbance byla měřena při 254 nm.

Použité koncentrace 6β-hydroxytestosteronu: 0; 10; 25; 50; 100; 250; 500 μM.

Pro stanovení schopnosti  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu inhibovat aktivitu CYP3A1 byla měřena míra tvorby  $6\beta$ -hydroxytestosteronu při různých koncentracích E2 a EE2. Výsledná koncentrace  $17\beta$ -estradiolu v reakční směsi byla  $0,5 - 500 \mu\text{M}$  a výsledná koncentrace  $17\alpha$ -ethinylestradiolu v reakční směsi byla  $5 - 500 \mu\text{M}$ . Koncentrace substrátu testosteronu byla  $50 \mu\text{M}$ . Aktivity CYP3A1 byly porovnány s kontrolní aktivitou CYP3A1 bez přídavku inhibitoru a následně byly vyneseny do grafu (Obr. 17 a Obr. 18 na str. 44). Body grafu byly v programu QtiPlot proloženy rovnicí pro vyhodnocení koncentrace  $\text{IC}_{50}$ .<sup>86</sup> Tato hodnota byla poté z proložené křivky odečtena. Pro  $17\beta$ -estradiol byla tato hodnota koncentrace  $\text{IC}_{50}(\text{CYP3A1}) = 27,6 \mu\text{M}$  a pro  $17\alpha$ -ethinylestradiol  $\text{IC}_{50}(\text{CYP3A1}) = 8,3 \mu\text{M}$ .

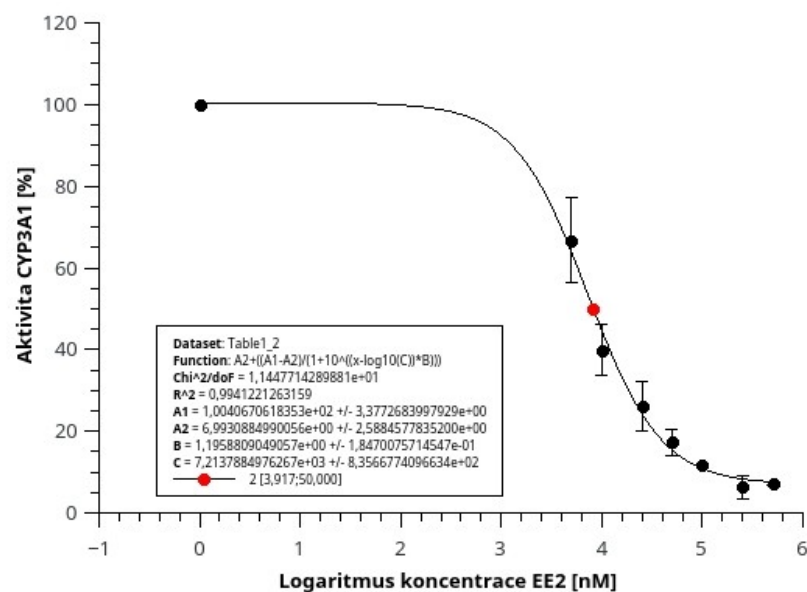


**Obr. 17:** Vliv  $17\beta$ -estradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP3A1 v Supersomech<sup>TM</sup>.

Závislost aktivity CYP3A1 na logaritmu koncentrace  $17\beta$ -estradiolu ( $0,5 - 500 \mu\text{M}$ ).

Inhibice aktivity CYPA1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přídavku inhibitoru.

Aktivita CYP3A1 byla stanovena reakcí  $6\beta$ -hydroxylace testosteronu.



**Obr.18:** Vliv 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu rekombinantního potkaního CYP3A1 v Supersomech<sup>TM</sup>. Závislost aktivity CYP3A1 na logaritmu koncentrace 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu (5 – 500  $\mu$ M). Inhibice aktivity CYP3A1 je vyjádřena v procentech kontrolní aktivity bez přídavku inhibitoru. Aktivita CYP3A1 byla stanovena reakcí 6 $\beta$ -hydroxylace testosteronu.

## 5 DISKUZE

Cytochromy P450 patří mezi klíčové enzymy (monooxygenasy) účastníci se metabolismu xenobiotik, kterými jsou léčiva, pesticidy, látky znečišťující životní prostředí i karcinogeny, a také endogenních látek jako jsou mastné kyseliny a steroidy.<sup>87</sup>

V rámci této bakalářské práce byl sledován vliv dvou estrogenních látek 17 $\beta$ -estradiolu a 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu potkaních cytochromů P450 1A1 a 3A1. Tyto estrogeny se řadí mezi endokrinní disruptory, které neblahým způsobem ovlivňují funkce endokrinního systému organismů.<sup>4</sup> 17 $\alpha$ -ethinylestradiol je silnější estrogenní sloučeninou než 17 $\beta$ -estradiol, neboť EE2 nese na C-17 ethinylovou skupinu, díky které je stabilnější vůči oxidaci.<sup>25</sup>

CYP1A1 je významný enzym účastník se biotransformace xenobiotik a aktivující širokou škálu karcinogenních látek.<sup>38</sup> Jeden z hlavních důvodů, proč byla inhibice CYP1A1 estrogeny v této práci studována, je ten, že estrogeny mohou snížit tvorbu některých kovalentních DNA aduktů odvozených od karcinogenů (BaP). Tvorba kovalentních aduktů karcinogenů s DNA je jednou z příčin vzniku nádorů.<sup>70</sup>

Pro sledování vlivu E2 a EE2 na aktivitu CYP1A1 byla použita markerová reakce *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD), při které bylo sledováno ovlivnění tvorby produktu resorufinu v závislosti na vzrůstající koncentraci estrogenů. U obou byla zjištěna inhibiční aktivita, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky, které ukázaly že 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethinylestradiol mají inhibiční účinky na *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu zprostředkovanou CYP1A1.<sup>88</sup>

Dále byla stanovena hodnota koncentrace E2 a EE2, při které je dosaženo 50% inhibice. Pro 17 $\beta$ -estradiol  $IC_{50}(CYP1A1) = 4,6 \mu M$  a pro 17 $\alpha$ -ethinylestradiol  $IC_{50}(CYP1A1) = 7,9 \mu M$ . Z těchto hodnot je vidět, že 17 $\beta$ -estradiol vykazuje téměř dvojnásobně vyšší inhibiční efekt vůči CYP1A1 než 17 $\alpha$ -ethinylestradiol.

Některé studie sledovaly vliv E2 a EE2 na aktivitu CYP i v jiných organismech. Inhibiční vliv E2 a EE2 na aktivitu CYP1A1 byl prokázán i v organismu prasete. Oba estrogeny v této studii vykazovaly silný inhibiční účinek na *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu zprostředkovanou CYP1A1.<sup>89</sup>

Následně bylo sledováno, zda aktivitu CYP1A1 inhibují metabolity E2 a EE2 vzniklé během preinkubace s CYP1A1 a NADPH. Byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ , pro E2 byla koncentrace  $IC_{50}$  po preinkubaci s NADPH  $IC_{50}(CYP1A1) = 2,1 \mu M$  a pro EE2  $IC_{50}(CYP1A1) = 1,9 \mu M$ . Při srovnání hodnot  $IC_{50}$  (preinkubace bez NADPH) s hodnotami  $IC_{50}$  (preinkubace s NADPH) lze říci, že metabolity studovaných estrogenů vzniklé při preinkubaci přispívají k inhibici CYP1A1 výrazněji než parentální molekuly. Hodnota  $IC_{50}$  pro E2 byla snížena přibližně o polovinu a hodnota  $IC_{50}$  pro EE2 byla téměř čtyřikrát nižší.  $17\beta$ -estradiol je enzymem CYP1A1 metabolizován z 80 % na 2-hydroxyestradiol a z 20 % na 4-hydroxyestradiol.<sup>28</sup>  $17\alpha$ -ethinylestradiol je enzymem CYP1A1 metabolizován na 2-hydroxyethinylestradiol a na prozatím neznámý X-hydroxyethinylestradiol.<sup>79</sup> Dá se tedy předpokládat, že aktivitu CYP1A1 inhibovaly některé z těchto metabolitů.

Jak již bylo řečeno, jeden z hlavních důvodů sledování inhibice CYP1A1 estrogeny je ten, že estrogeny mohou snížit tvorbu kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP. V rámci studie již prováděné na naší katedře se ukázalo, že tvorba kovalentních DNA aduktů odvozených od BaP byla vlivem E2 a EE2 *in vivo* i *in vitro* snížena.<sup>70</sup> CYP1A1 může ovlivňovat metabolismus xenobiotik ve směru aktivace i detoxikace, neboť CYP1A1 je enzym s aktivační i detoxikační funkcí. Z výsledků je možné usoudit, že působením estrogenů E2 a EE2 se sníží působení karcinogenních sloučenin, které jsou aktivovány CYP1A1, a mohou modulovat jejich genotoxické působení.

Z dřívějších studií provedených v laboratoři molekulární karcinogenese a vývoje léčiv na katedře biochemie je známo, že  $17\beta$ -estradiol a  $17\alpha$ -ethinylestradiol mají inhibiční účinek na aktivitu CYP3A1/2.<sup>33</sup> Pro sledování vlivu E2 a EE2 na aktivitu CYP3A1 byla použita markerová reakce  $6\beta$ -hydroxylace testosteronu, bylo sledováno ovlivnění tvorby produktu  $6\beta$ -hydroxytestosteronu

v závislosti na vzrůstající koncentraci estrogenů. U obou estrogenů byla zjištěna inhibiční aktivita, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky, které ukazují, že aktivita CYP3A1 v játrech potkanů je vlivem E2 a EE2 snížena.<sup>33,74</sup> U obou estrogenů byla stanovena hodnota koncentrace sloučeniny, při které je dosaženo 50% inhibice. Konkrétně pro 17 $\beta$ -estradiol  $IC_{50}(CYP3A1) = 27,6 \mu M$  a pro 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu  $IC_{50}(CYP3A1) = 8 \mu M$ . V tomto případě je silnějším inhibitorem CYP3A1 17 $\alpha$ -ethinyestradiol, neboť vykazuje trojnásobně vyšší inhibiční efekt oproti 17 $\beta$ -estradiolu. Z výsledků vyplývá, že oba estrogeny E2 i EE2 jsou účinnými inhibitory CYP3A1.

V této bakalářské práci nebyl sledován vliv metabolitů estrogenů na CYP3A1, ale výsledky z dřívějších studií<sup>33</sup> ukazují, že by reaktivní metabolity E2 a EE2 vzniklé při preinkubaci s NADPH mohly vykazovat silnější inhibiční vlastnosti vůči CYP3A1 než samotné estrogeny. 17 $\beta$ -estradiol je totiž enzymem CYP3A1/2 metabolizován na 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol a 16 $\alpha$ -hydroxylací na estriol.<sup>28</sup> 17 $\alpha$ -ethinylestradiol je enzymem CYP3A1/2 metabolizován na 2-hydroxyethinylestradiol a prozatím neznámý X-hydroxyethinylestradiol.<sup>33</sup>

EE2 je inhibitorem také 11 lidských isoform CYP, mezi něž patří CYP1A1 a CYP3A4. Pro oba jsou známy koncentrace  $IC_{50}$ . Pro EE2 je koncentrace  $IC_{50}(CYP1A1) = 2,7 \pm 0,3 \mu M$  a  $IC_{50}(CYP3A4) = 8,5 \pm 0,7 \mu M$ .<sup>75</sup> Hodnoty  $IC_{50}$  stanovené pro lidské isoformy CYP<sup>75</sup> jsou velmi podobné námi zjištěným hodnotám  $IC_{50}$  17 $\alpha$ -ethinylestradiolu, které jsme stanovili pro potkaní isoformy CYP.

Je prokázáno, že specifická aktivita CYP3A4 u uživatelůk užívajících hormonální antikoncepci obsahující ethinylestradiol a levonogestrel<sup>90</sup> a ethinylestradiol a gestoden<sup>91</sup> je snížena.

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala studiu vlivu estrogenů  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu cytochromů P450 1A1 a 3A1.

V teoretické části jsou z odborné literatury shrnuty vlastnosti, metabolismus a vliv  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na cytochromy P450 1A1 a 3A1.

Experimentální část je zaměřena na inhibiční efekt těchto estrogenů na aktivitu CYP1A1 a CYP3A1.

Provedené experimenty poskytly tyto výsledky:

- Byl potvrzen inhibiční vliv  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu na aktivitu CYP1A1 a CYP3A1. Silnějším inhibitorem aktivity CYP1A1 je  $17\beta$ -estradiol a silnějším inhibitorem CYP3A1 je  $17\alpha$ -ethinylestradiol.
- Prokázalo se, že aktivitu CYP1A1 inhibují metabolity  $17\beta$ -estradiolu a  $17\alpha$ -ethinylestradiolu vzniklé při preinkubaci estrogenů a CYP1A1 s NADPH.
- Byly stanoveny koncentrace studovaných estrogenů způsobující 50% inhibici ( $IC_{50}$ ) CYP1A1 a CYP3A1.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Snyder, S. A., Westerhoff, P., Yoon, Y. & Sedlak, D. L.: Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. *Environ. Eng. Sci.* **20**, 449–469 (2003).
2. Amaral Mendes, J. J.: The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 781–788 (2002).
3. Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z. & Vaněk, T.: Léčiva - ‘nový’ environmentální polutant. *Chem. List.* **103**, 540–547 (2009).
4. Chemicals - Environment - European Commission. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports\\_conclusions\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm) [vid. 21. 10. 2017]
5. Křesinová, Z., Svobodová, K. & Cajthaml, T.: Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chem. List.* **103**, 200–207 (2009).
6. Vlachogianni, T., Fiotakis, K., Loridas, S. & Valavanidis, A.: Environmental Pollution by Endocrine Disrupting Chemicals. Adverse Developmental, Reproductive and Immune Effects in the Wildlife and in Human Health. *WEB SITE, Dpt Chem. Univ. Athens* **1**, 1–54 (2013).
7. Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, J. C., Corton, J. C., Safe, S. H., Van der Saag, P. T., Van der Burg, B. & Gustafsson, J. A.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252–4263 (1998).
8. Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G.: Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1671–1692 (2010).
9. Murkies, A. L., Wilcox, G. & Davis, S. R.: Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 297–303 (1998).
10. Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D. & Lester, J. N.: Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3890–3894 (2000).
11. Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D. & Yang, Y.: Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ. Int.* **99**, 107–119 (2017).

12. Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P.: Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Curr. Genomics* **7**, 497–508 (2006).
13. Hilder, T. A. & Hodgkiss, J. M.: Molecular Mechanism of Binding between 17 $\beta$ -Estradiol and DNA. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **15**, 91–97 (2016).
14. Hall, J. M., Couse, J. F. & Korach, K. S.: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 36869–36872 (2001).
15. Giesy, J. P., Hilscherova, K., Jones, P. D., Kannan, K. & Machala, M.: Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* **45**, 3–16 (2002).
16. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. & Huber, J. C.: Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* **346**, 340–352 (2002).
17. Estradiol metabolism. Dostupné z: <http://pathwaymaps.com/maps/850> [vid. 18.3.2018]
18. Lee, A. J., Cai, M. X., Thomas, P. E., Conney, A. H. & Zhu, B. T.: Characterization of the Oxidative Metabolites of 17 $\beta$ -Estradiol and Estrone Formed by 15 Selectively Expressed Human Cytochrome P450 Isoforms. *Endocrinology* **144**, 3382–3398 (2003).
19. Dawling, S., Roodi, N. & Parl, F. F.: Methoxyestrogens Exert Feedback Inhibition on Cytochrome P450 1A1 and 1B1. *Cancer Res.* **63**, 3127–3132 (2003).
20. Badawi, A. F., Cavalieri, E. L. & Rogan, E. G.: Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16 $\alpha$ -hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol. *Metabolism*. **50**, 1001–1003 (2001).
21. Jin, C. J., Miners, J. O., Lillywhite, K. J. & Mackenzie, P. I.: cDNA cloning and expression of two new members of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 496–503 (1993).
22. Makaji, E., Trambitas, C. S., Shen, P., Holloway, A. C. & Crankshaw, D. J.: Effects of Cytochrome P450 Inhibitors on the Biotransformation of Fluorogenic Substrates by Adult Male Rat Liver Microsomes and cDNA-Expressed Rat Cytochrome P450 Isoforms. *Toxicol. Sci.* **113**, 293–304 (2010).

23. Colman, J. R., Baldwin, D., Johnson, L. L. & Scholz, N. L.: Effects of the synthetic estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **91**, 346–354 (2009).
24. Shareef, A., Angove, M. J., Wells, J. D. & Johnson, B. B.: Aqueous Solubilities of Estrone, 17 $\beta$ -Estradiol, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, and Bisphenol A. *J. Chem. Eng. Data* **51**, 879–881 (2006).
25. Tilton, S. C., Foran, C. M. & Benson, W. H.: Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 352–359 (2005).
26. Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S. & Praveena, S. M.: Occurrence of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* **69**, 104–119 (2014).
27. Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K. & Řezanka, T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* **157**, 3325–3335 (2009).
28. Tsuchiya, Y., Nakajima, M. & Yokoi, T.: Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* **227**, 115–124 (2005).
29. Rogers, S., Back, D. & Orme, M.: Intestinal metabolism of ethinyloestradiol and paracetamol in vitro: studies using Ussing chambers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **23**, 727–734 (1987).
30. Peter Guengerich, F.: Metabolism of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol in humans. *Life Sci.* **47**, 1981–1988 (1990).
31. Wang, B., Sanchez, R. I., Franklin, R. B., Evans, D. C. & Huskey, S. E. W.: The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1209–1212 (2004).
32. Ball, S. E., Forrester, L. M., Wolf, C. R. & Back, D. J.: Differences in the cytochrome P-450 isoenzymes involved in the 2-hydroxylation of oestradiol and 17  $\alpha$ -ethinyloestradiol. Relative activities of rat and human liver enzymes. *Biochem. J.* **267**, 221–6 (1990).
33. Bořek-Dohalská, L., Valášková, P., Černá, V. & Stiborová, M.: Role of rat cytochromes P450 in the oxidation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38**, 852–860 (2014).

34. Schmid, S. E., Au, W. Y., Hill, D. E., Kadlubar, F. F. & Slikker, W.: Cytochrome P-450-dependent oxidation of the 17 alpha-ethynyl group of synthetic steroids. D-homoannulation or enzyme inactivation. *Drug Metab. Dispos.* **11**, (1983).
35. Helton, E. D. & Goldzieher, J. W.: Metabolism of ethynyl estrogens. *J. Toxicol. Environ. Health* **3**, 231–241 (1977).
36. Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L.: Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 565–601 (1992).
37. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J., Martínek, V. & Páca, J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. List.* **98**, 876–890 (2004).
38. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P. & Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. List.* **93**, 229–237 (1999).
39. Manikandan, P. & Nagini, S.: Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* **19**, 38–54 (2018).
40. Spatzenegger, M. & Jaeger, W.: Clinical Importance of Hepatic Cytochrome P450 in Drug Metabolism. *Drug Metab. Rev.* **27**, 397–417 (1995).
41. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus I. C. & Nebert, D. W.: P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42 (1996).
42. Correia, M. A. & Montellano, P. R. O. de.: Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes v knize *Cytochrome P450* (Boston, MA: Springer), str. 247–322 (1995)
43. Orr, S. T. M., Ripp, S. L., Ballard, T. E., Henderson, J. L., Scott, D. O., Obach, R. S., Sun, H. & Kalgutkar, A. S.: Mechanism-Based Inactivation (MBI) of Cytochrome P450 Enzymes: Structure–Activity Relationships and Discovery Strategies To Mitigate Drug–Drug Interaction Risks. *J. Med. Chem.* **55**, 4896–4933 (2012).
44. CYP1A1 - Cytochrome P450 1A1 - Homo sapiens (Human) - CYP1A1 gene & protein. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04798> [vid. 25. 10. 2017]

45. Cornelissen, S., Julsing, M. K., Schmid, A. & Bühler, B.: Comparison of microbial hosts and expression systems for mammalian CYP1A1 catalysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 275–287 (2012).
46. Walsh, A. A., Szklarz, G. D. & Scott, E. E.: Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *J. Biol. Chem.* **288**, 12932–12943 (2013).
47. Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H. & Loeb, L. A.: Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **14**, 473–486 (2004).
48. Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y. & Dalton, T. P.: Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65–85 (2000).
49. Whitlock, J. P.: Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103–125 (1999).
50. Guengerich, F. P.: Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–650 (2001).
51. Murray, R. K., Rodwell, V. W., Bender, D., Botham, K. M., Weil, P. A. & Kennelly, P.: Harperova ilustrovaná biochemie, (McGraw-Hill Medical), str. 664 (2012).
52. Bruno, R. D. & Njar, V. C. O.: Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5047–5060 (2007).
53. Liu, J., Sridhar, J. & Foroozesh, M.: Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules* **18**, 14470–14495 (2013).
54. Wilkinson, G. R.: Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of *in vivo* activity in humans. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **24**, 475–490 (1996).
55. Martignoni, M., Groothuis, G. M. M. & de Kanter, R.: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875–894 (2006).

56. Debri, K., Boobis, A. R., Davies, D. S. & Edwards, R. J.: Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 2047–2056 (1995).
57. Debri, K., Boobis, A. R., Davies, D. S. & Edwards, R. J.: Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 2047–2056 (1995).
58. LeCluyse, E. L.: Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **134**, 283–289 (2001).
59. François Berthou.: Cytochrome P450 enzyme regulation by induction and inhibition. Skriptum Universidad de Chile, (2001).
60. Klierer, S. A., Goodwin, B. & Willson, T. M.: The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocr. Rev.* **23**, 687–702 (2002).
61. Li, L., Li, Z., Deng, C., Ning, M., Li, H., Bi, S., Zhou, T. & Lu, W.: A mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for CYP3A1/2 induction by dexamethasone in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 127–136 (2012).
62. Ejiri, N., Katayama, K. & Doi, K.: Induction of CYP3A1 by dexamethasone and pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Toxicol. Pathol.* **54**, 273–279 (2003).
63. Cyp3a1 - Cytochrome P450 3A1 - Rattus norvegicus (Rat) - Cyp3a1 gene & protein. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04800> [vid. 3. 3. 2018]
64. Cyp3a2 - Cytochrome P450 3A2 - Rattus norvegicus (Rat) - Cyp3a2 gene & protein. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05183> [vid. 3. 3. 2018]
65. Turan, V. K., Mishin, V. M. & Thomas, P. E.: Clotrimazole is a Selective and Potent Inhibitor of Rat Cytochrome P450 3A Subfamily-Related Testosterone Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 837–842 (2001).
66. Go, R., Hwang, K., Kim, C., Byun, Y., Nam, K. & Choi, K.: Effect of dioxin and 17 $\beta$ -estradiol on the expression of cytochrome P450 1A1 gene via an estrogen receptor dependent pathway in cellular and xenografted models. *Environ. Toxicol.* **32**, 2225–2233 (2017).

67. Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863–870 (1997).
68. Matthews, J. & Gustafsson, J.-Å.: Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, (2006).
69. Ricci, M. S., Toscano, D. G., Mattingly, C. J. & Toscano, W. A.: Estrogen Receptor Reduces CYP1A1 Induction in Cultured Human Endometrial Cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 3430–3438 (1999).
70. Stiborová, M., Dračínská, H., Bořek-Dohalská, L., Klusoňová, Z., Holecová, J., Martínková, M., Schmeiser, H. H. & Arlt Volker, M.: Exposure to endocrine disruptors 17alpha-ethinylestradiol and estradiol influences cytochrome P450 1A1-mediated genotoxicity of benzo[a]pyrene and expression of this enzyme in rats. *Toxicology* **400–401**, 48–56 (2018).
71. Choi, S.-Y., Fischer, L., Yang, K., Chung, H. & Jeong, H.: Isoform-specific regulation of cytochrome P450 expression and activity by estradiol in female rats. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 777–782 (2011).
72. Kobayashi, H., Yoshida, S., Sun, Y.-J., Shirasawa, N. & Naito, A.: Gastric estradiol-17 (E2) and liver ER correlate with serum E2 in the cholestatic male rat. *J. Endocrinol.* **219**, 39–49 (2013).
73. Borek-Dohalska, L., Klusoňová, Z., Holecová, J., Martínková, M., Bárta, F., Dračínská, H., Cajthaml, T. & Stiborová, M.: Exposure of rats to exogenous endocrine disruptors 17alpha-ethinylestradiol and benzo(a)pyrene and an estrogenic hormone estradiol induces expression of cytochromes P450 involved in their metabolism. *Neuro Endocrinol. Lett.* **37**, 84–94 (2016).
74. Holecová, J.: Vliv vybraných endokrinních disruptorů na cytochromy P450 1B1 a 3A1/2. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie. (2017)
75. Chang, S. Y., Chen, C., Yang, Z. & Rodrigues, A. D.: Further assessment of 17alpha-ethinyl estradiol as an inhibitor of different human cytochrome P450 forms *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 1667–1675 (2009).
76. Montellano, P. R. O. de, Kunze, K. L., Yost, G. S. & Mico, B. A.: Self-catalyzed destruction of cytochrome P-450: covalent binding of ethynyl sterols to prosthetic heme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 746–749 (1979).

77. Zhang, H., Cui, D., Wang, B., Han, Y., Balimane, P., Yang, Z., Sinz, M. & Rodrigues, A. D.: Pharmacokinetic drug interactions involving 17 alpha-ethinylestradiol - A new look at an old drug. *Clin. Pharmacokinet.* **46**, 133–157 (2007).
78. Back, D. J., Maggs, J. L., Purba, H. S., Newby, S. & Park, B. K.: 2-Hydroxylation of ethinyloestradiol in relation to the oxidation of sparteine and antipyrine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **18**, 603–7 (1984).
79. Bořek-Dohalská, L., Valášková, P., Kubíčková, B., Šulc, M., Křesinová, Z., Cajthaml, T. & Stiborová, M.: A study on 17alpha-ethinylestradiol metabolism in rat and *Pleurotus ostreatus*. *Neuro Endocrinol. Lett.* **36**, 5–12 (2015).
80. Guengerich, F. P.: Oxidation of 17 alpha-ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **33**, (1988).
81. Kent, U. M., Mills, D. E., Rajnarayanan, R. V., Alworth, W. L. & Hollenberg, P. F.: Effect of 17- $\alpha$ -Ethinylestradiol on Activities of Cytochrome P450 2B (P450 2B) Enzymes: Characterization of Inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and Identification of Metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 549–558 (2002).
82. Rodrigues, A. D. & Lu, P.: Is 17alpha-ethinyl estradiol an inhibitor of cytochrome P450 2C19? *Drug Metab. Dispos.* **32**, 364–5 (2004).
83. Walsky, R. L., Gaman, E. A. & Obach, R. S.: Examination of 209 Drugs for Inhibition of Cytochrome P450 2C8. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 68–78 (2005).
84. Burke, M. D. & Mayer, R. T.: Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* **2**, 583–8
85. Volpe, D. A., Hamed, S. S. & Zhang, L. K.: Use of Different Parameters and Equations for Calculation of IC<sub>50</sub> Values in Efflux Assays: Potential Sources of Variability in IC<sub>50</sub> Determination. *AAPS J.* **16**, 172–180 (2014).
86. Krauser, J. A. & Guengerich, F. P.: Cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6beta-hydroxylation stereochemistry, kinetic deuterium isotope effects, and rate-limiting steps. *J. Biol. Chem.* **280**, 19496–506 (2005).



87. Lin, H., Kent, U. M. & Hollenberg, P. F.: Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17  $\alpha$ -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 160–7 (2002).
88. Klinger, W., Lupp, A., Karge, E., Baumbach, H., Eichhorn, F., Feix, A., Földner, F., Gernhardt, S., Knels, L., Kost, B., Mertens, G., Werner, F., Oettel, M., Römer, W., Schwarz, S. & Elger, W., Schneider, B.: Estradiol, testosterone, dehydroepiandrosterone and androstenedione: novel derivatives and enantiomers. Interactions with rat liver microsomal cytochrome P450 and antioxidant/radical scavenger activities in vitro. *Toxicol. Lett.* **128**, 129–144 (2002).
89. Zamaratskaia, G., Rasmussen, M. K., Herbin, I., Ekstrand, B. & Zlabek, V.: *In vitro* inhibition of porcine cytochrome P450 by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -estradiol. *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 78–84 (2011).
90. Shibasaki, H., Kuroiwa, M., Uchikura, S., Tsuboyama, S., Yokokawa, A., Kume, M. & Furuta T.: Use of endogenous cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation clearance for phenotyping in vivo CYP3A activity in women after sequential administration of an oral contraceptive (OC) containing ethinylestradiol and levonorgestrel as weak CYP3A inhibitors. *Steroids* **87**, 137–144 (2014).
91. Palovaara, S., Kivistö, K. T., Tapanainen, P., Manninen, P., Neuvonen, P. J. & Laine, K.: Effect of an oral contraceptive preparation containing ethinylestradiol and gestodene on CYP3A4 activity as measured by midazolam 1'-hydroxylation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **50**, 333–7 (2000).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]